

Positionale Klonierung und Charakterisierung
einer Mutation im Condensin zCAP-G-Gen
des Zebrafisches, *Danio rerio*

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Sabine Seipold
aus Herten

I. Referent:	Prof. Dr. Ralf Schnabel
2. Referent:	Prof. Dr. Norbert F. Käufer
Eingereicht am:	07.05.2008
Mündliche Prüfung (Disputation) am:	08.08.2008
Druckjahr	2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Der Zebrafisch als Modellorganismus	7
1.1.1	Der Zebrafisch in Zell- und Entwicklungsbiologie	8
1.1.2	Genetik und Genomik	11
1.2	Augenentwicklung als zellbiologisches Modell für die Entwicklung des Zentralnervensystems	12
1.3	Positionale Klonierung von Zebrafisch-Mutationen	17
1.3.1	Genetisch gleiche, stabile Linien	17
1.3.2	Mutagenese	18
1.3.3	Marker und ihre Auswertung	19
1.3.4	Physikalische genomische Librarys	19
1.3.5	Genom-Sequenzierung	21
1.3.6	Kreuzungsschema für das positionale Klonieren	22
1.4	Die Condensin-Komplexe und ihre Funktion während des Zellzyklus	24
1.4.1	Entdeckung der Condensin-Komplexe	24
1.4.2	Die molekulare Architektur der Condensin-Komplexe	25
1.4.3	Die Funktion der Condensin-Komplexe	27
2	Material und Methoden	29
2.1	Untersuchungsobjekt	29
2.1.1	Die Zebrafisch-Mutante <i>creature from the black lagoon</i>	29
2.1.2	Stämme, Haltung und Präparation	29
2.2	Molekularbiologische Methoden	30
2.2.1	DNA-Isolierung	30
2.2.2	RNA-Isolierung	31

2.2.3 Plasmid-Präparation (Miniprep)	31
2.2.4 cDNA-Synthese	32
2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion	32
2.2.6 A-tailing von PCR-Produkten	33
2.2.7 Dephosphorylierung von Vektoren	33
2.2.8 Restriktionsverdau	33
2.2.9 Ligation	34
2.2.10 Transfomation von chemisch kompetenten Zellen	34
2.2.11 Gelelektrophorese	34
2.2.12 Sequenzierung	35
2.2.13 Simple Sequence Length Polymorphism Analyse	35
2.2.14 Single Strand Conformation Polymorphism Analyse	35
2.2.15 BAC-Library-Screen	35
2.2.16 Verdau von DNA-Matrizen für Sense- oder Anti-Sense-RNA- Transkription	36
2.2.17 Herstellung von Sense-RNA für Mikroinjektion	37
2.2.18 Herstellung von Anti-Sense-RNA-Sonden für <i>In Situ</i> -Hybridisierung	38
2.3 Biochemische Methoden	39
2.3.1 Protein-Blotting	39
2.4 Zellbiologie	42
2.4.1 Herstellung von Vibratom-Schnitten	42
2.4.2 Herstellung von Gefrierschnitten	42
2.4.3 Herstellung von Plastikschnitten	42
2.4.4 Injektionen	43
2.4.5 Immunhistochemie	44
2.4.6 Apoptose-Detektion	45
2.4.7 BrdU-Färbung	45
2.4.8 Aktin-Färbung	45
2.4.9 Alcian Blue-Färbung	45
2.4.10 HE-Färbung von Plastik-Schnitten	46
2.4.11 <i>In Situ</i> -Hybridisierung	46
2.5 Materialien	50
2.5.1 Lösungen und Puffer	50
2.5.2 Antikörper	56
2.5.3 Primer	57
2.5.4 <i>In Situ</i> -Sonden	59
2.5.5 Morpholinos	59
2.5.6 Plasmide	60
2.5.7 Chemikalien	61
2.5.8 Geräte	61
2.5.9 Verbrauchsmaterial	62
2.5.10 Bildbearbeitung und Bioinformatik	62

3 Ergebnisse	65
3.1 Die Mutante <i>creature from the black lagoon</i>	65
3.1.1 Äußeres Erscheinungsbild	65
3.1.2 Histologische Schnitte von <i>cbl</i> -Mutanten zeigen Veränderungen und eine Reduktion der Anzahl der Zellen in der neuronalen Retina	66
3.2 Positionales Klonieren	68
3.2.1 Feinkartierung anhand von SSLP Markern der Tübingen Map	68
3.2.2 SSCPs von EST-Sequenzen	69
3.2.3 Die zweite Montage des Zebrafisch-Genoms (Zv2)	69
3.2.4 Contig-Identifikation durch ESTs	71
3.2.5 SNP-Identifikation	71
3.2.6 BAC-Sequenzen und Microsatellite Marker	72
3.2.7 BAC-Assembly	72
3.2.8 BAC-Library-Screen	73
3.2.9 Die fünfte Montage des Zebrafisch Genoms (Zv5)	73
3.2.10 Syntänien mit <i>Tetraodon nigroviridis</i> und Mensch	74
3.2.11 BAC-Alignment und Verifikation durch zK148F2b	74
3.2.12 Identifikation von Open Reading Frames durch Genscan	72
3.2.13 <i>In situ</i> -Hybridisierung	75
3.2.14 Identifizierung des Gens <i>zcap-g</i>	75
3.2.15 Sequenzierung	75
3.2.16 Protein-Sequenz und Domänen	75
3.2.17 Klonierungen	77
3.2.18 Der <i>cbl</i> -Phänotyp konnte durch RNA-Injektion nicht gerettet werden	77
3.2.19 Durch Injektion von Morpholino-Oligonukleotiden können <i>cbl</i> -Phänotypen erzeugt werden	78
3.3 Phänotypische Charakterisierung	80
3.3.1 Expression von <i>zcap-g</i>	80
3.3.1 Die Expression von <i>zcap-g</i> korreliert mit dem Muster der Zellproliferation	81
3.3.1 Die Neurogenese in <i>cbl</i> -Mutanten ist nicht verzögert	82
3.3.1 Die Zahl der Zellen in der neuronalen Retina ist in <i>cbl</i> -Mutanten reduziert	83
3.3.1 Die Zelltypen der Retina werden ausdifferenziert	85
3.3.1 Aktivierung von Apoptose im zentralen Nervensystem kennzeichnet <i>cbl</i> -Mutanten	87
3.3.1 In <i>cbl</i> -Embryonen lässt sich Apoptose zwischen 28 hpf und 3 dpf im zentralen Nervensystem nachweisen	89
3.3.1 Der zeitliche Verlauf der Apoptose im Auge korreliert mit dem Muster der Zellproliferation	91
3.3.1 Morphologie mitotischer Zellkerne in <i>cbl</i> -mutanten Retinae	93
3.3.1 Chromatin-Brücken in mitotischen Zellen von <i>cbl</i> -Retinae	95

3.3.1 Die Zellkerne der <i>cbl</i> -mutanten Retina sind vergrößert	95
3.3.1 Im Knorpelgewebe treten in <i>cbl</i> -Mutanten größere Zellen auf	99
3.3.1 Zellzyklus und Proliferation in <i>cbl</i> -Mutanten weisen keine Defekte auf und die S-Phase ist nicht verlängert	100
3.3.1 In <i>cbl</i> -Retinae treten mitotische Zellen in die Apoptose ein, ohne den Zellzyklus anzuhalten	103
4 Diskussion	105
4.1 Die Funktion von zCAP-G	105
4.1.1 zCAP-G und mitotische Chromosomen-Struktur	105
4.1.2 Die Rolle von zCAP-G im Nervensystem	110
5 Bibliografie	115
6 Zusammenfassung	125
7 Summary	126
8 Anhang	127
8.1 Abkürzungen	127
8.2 Marker und getestete Embryonen	130
8.3 Tabellen	134
9 Danksagung	137

1 Einleitung

1.1 Der Zebrafisch als Modellorganismus

Ein zentrales Thema der Biologie ist es, fundamentale genetische und zellbiologische Mechanismen der Entwicklung der Metazoa zu verstehen. Die Erforschung der Invertebraten *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* hat in dieser Hinsicht einen großen Beitrag geleistet. Die Entwicklung der Vertebraten birgt jedoch einige Besonderheiten, deren zelluläre Mechanismen und Genetik nicht mit diesen Modellorganismen aufzuklären sind, z. B. die Neuralleistenbildung und die Entwicklung komplexer Organsysteme wie Zentralnervensystem, Kardiovaskulär-System, Nieren und Knochen. Die Nachteile der bisher verwendeten Modellorganismen verhinderten einen detaillierten Einblick in die Entwicklung dieser Organsysteme. In der Maus findet die Entwicklung zum Beispiel innerhalb des Uterus der Mutter statt, so dass die Embryonen einer direkten Beobachtung nicht zugänglich sind; Hühnereier sind zu groß für mikroskopische Untersuchungen oder für Screens mit hohem Durchsatz; und *Xenopus laevis* – ansonsten sehr gut geeignet für entwicklungsbiologische Studien – ist allotetraploid und damit für genetische Untersuchungen ungeeignet. Der Zebrafisch (eigentlich Zebraäbrbling) *Danio rerio* vereint alle Vorteile in dieser Hinsicht.

George Streisinger von der University of Oregon erkannte das Potenzial dieses kleinen tropischen Süßwasserfischs, der in jeder Zoohandlung zu haben ist, und veröffentlichte 1981 eine Arbeit, in der er die Produktion von homozygot diploiden Tieren und deren Klonierung beschrieb (Streisinger et al., 1981). *Danio rerio*, damals noch *Brachydanio rerio*, entwickelte sich schnell zu einem bei Genetikern beliebten Untersuchungsobjekt, nachdem Streisinger weitere Arbeiten veröffentlichte, in denen er Methoden für Mutagenese (Grunwald und Streisinger, 1992a; Grunwald und Streisinger, 1992b; Walker und Streisinger, 1983), “Genetic Mapping” (Streisinger et al., 1986), Herstellung von genetischen Mosaiken (Streisinger et al., 1989) und der Anwendung von Mutagenese-Screens für die Identifizierung von zygotisch letalen rezessiven Mutationen (Grunwald et al., 1988) beschrieb.

1.1.1 Der Zebrafisch in Zell- und Entwicklungsbiologie

Die Embryonalentwicklung von *Danio rerio* findet außerhalb der Muttertiere statt, so dass sie direkter Beobachtung zugänglich ist. Das hat den Vorteil, dass das Stadium der Entwicklung leicht bestimmbar ist, Manipulationen an lebenden Embryonen durchgeführt werden können und die Muttertiere nicht geopfert werden müssen.

Ein weiterer Vorteil ist die sehr schnelle Entwicklung der Embryonen (Abbildungen 1 und 2). Die Furchungsteilungen führen innerhalb von 3 h (bei 28,5 °C) zu 1000 Zellen, die Gastrulation beginnt nach 5 h, die Gehirn-Anlage zeigt sich nach 9 h, Somitogenese und primäre Organogenese beginnen nach 10 h und nach 24 h sind die Anlagen für alle lebenswichtigen Organe vorhanden. In diesem Stadium sind alle Somiten bereits ausgebildet, der Embryo ist in der ganzen Länge vom differenzierten Notochord (Chorda dorsalis) durchzogen, die Gehirn-Morphogenese ist mit der Segmentierung der Rhombomere weit fortgeschritten, die ersten Motor- und Sinnes-Neuronen enervieren Muskeln und Haut und führen zu Kontraktionen bei Berührung, und das Herz beginnt zu schlagen (Kimmel et al., 1995). Die Embryonalentwicklung ist nach zwei Tagen abgeschlossen. Da die Embryonen bis zu einem Alter von 24 h transparent und in späteren Stadien semitransparent sind, sind sie für Lebendbeobachtungen, für Färbungen und Manipulationen, sowie Injektionen von Tracer-Molekülen oder Exprimierung von GFP-Fusionsproteinen gut geeignet.

Die Embryonen, die sich synchron bei 20 - 30° C entwickeln, sind groß genug (0,7 mm) für manuelle Manipulationen wie Transplantationen, und klein genug, um im Ganzen und in großer Anzahl unter dem Mikroskop beobachtet werden zu können. Die Tiere sind außerdem leicht in großen Mengen auf engem Raum zu halten, legen 100 – 200 Eier pro Gelege, sind das ganze Jahr über fruchtbar und haben eine Generationszeit von nur 3 Monaten. Es ist zudem möglich, Spermien aus lebenden Männchen zu gewinnen und zur späteren Verwendung einzufrieren.

Nachteile liegen vor allem darin, dass der Zebrafisch in der Forschung noch neu ist und dadurch die verfügbaren Ressourcen gering sind. Es mangelt z. B. an spezifischen Antikörpern, bekannten Mutationen, transgenen Reporter- und Aktivator-Linien, wie in *Drosophila* und Maus verwendet. Auch die allgemeine Datenlage, auf der die Forschung aufbauen kann, ist noch nicht sehr groß. Viele Ergebnisse, die in anderen Organismen gewonnen wurden, sind nicht ohne Weiteres auf den Zebrafisch übertragbar und müssen zunächst auf ihre Anwendung im Zebrafisch überprüft werden.

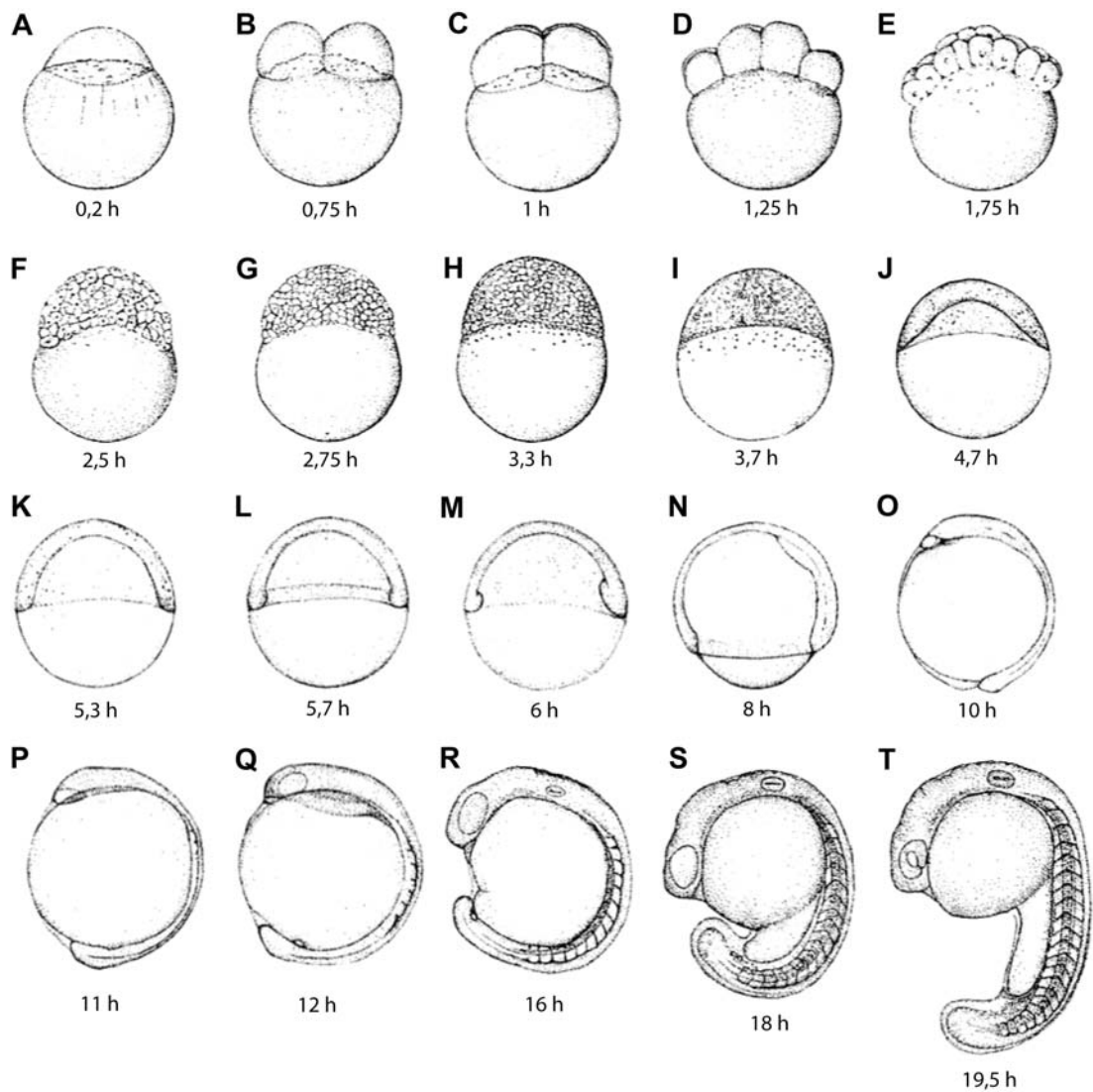


Abb.1: Stadien der Embryonalentwicklung beim Zebrafisch: Befruchtung bis 21-Somiten. A bis I: Furchung, J bis N: Epibolie, L bis N: Gastrulation, O-T: Somitogenese. Die Zeitangaben beziehen sich auf die Entwicklung bei 28,5 °C. Alle Bilder im gleichen Maßstab, Ei-Durchmesser 0,7 mm. (Kimmel et al., 1995)

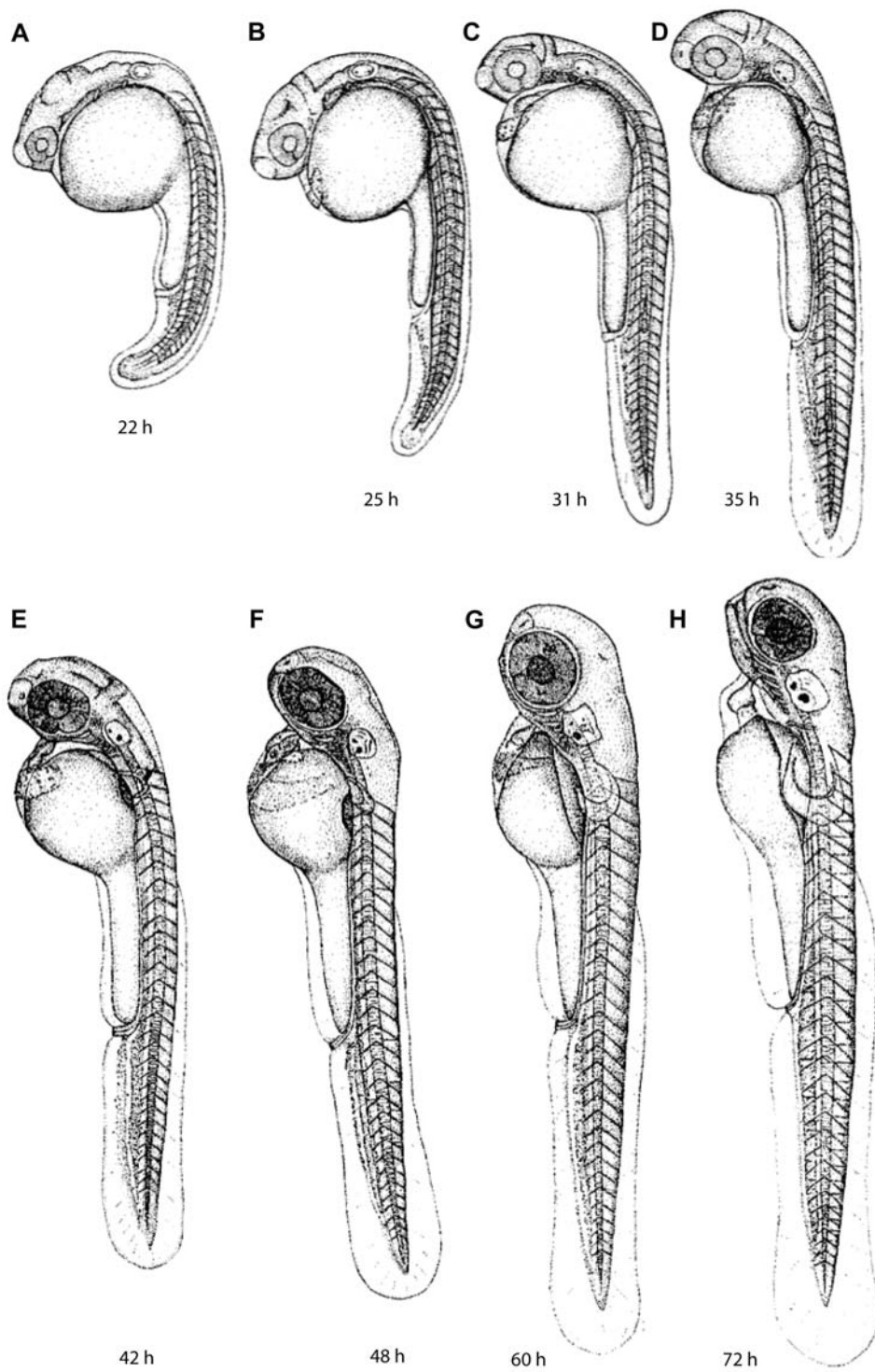


Abb. 2: Stadien der Embryonalentwicklung beim Zebrafisch: 26 Somiten bis 72 hpf. Die Zeitangaben beziehen sich auf die Entwicklung bei 28,5 °C. Maßstab wie Abb. 1. (Kimmel et al., 1995)

1.1.2 Genetik und Genomik

Der Zebrafisch ist zugänglich für genetische Analysen, da er nicht nur in entwicklungsbiologischer Hinsicht praktikabel ist, sondern es auch ermöglicht, die bisher nur bei Invertebraten angewendeten genetischen Methoden auf Vertebraten-spezifische Fragen anzuwenden. Dazu gehört vor allem das Mutagenese-Screening in großem Maßstab.

Die Verfügbarkeit von genetischen Karten mit einer hohen Dichte an Markern, physikalischen Genom-Librarys und das fast komplett durchsequenzierte Genom sind schon jetzt eine gute Grundlage für das positionale Klonieren von Mutanten. Diese Ressourcen werden ständig verbessert und ergänzt (siehe Kapitel positionales Klonieren).

Der Zebrafisch war der erste Vertebrat, in dem ein Mutagenese-Screening in großem Maßstab durchgeführt wurde. In den beiden ersten großen Screens von Tübingen und Boston (Driever et al., 1996; Haffter und Nüsslein-Volhard, 1996) wurden über 4000 Mutationen in ca. 400 Genen gefunden, die für die Zebrafisch-Entwicklung essentiell sind. Neben Mutagenese-Screening sind noch andere Methoden verfügbar, die eine Änderung des Genoms bewirken. Dazu gehören TILLING (targeting induced local lesions in genomes) (Draper et al., 2004; Stemple, 2004; Wienholds und Plasterk, 2004; Wienholds et al., 2002) und Insertionale Mutagenese (Amsterdam et al., 1999; Gaiano et al., 1996). Für den gezielten, wenn auch nur vorübergehenden Knockdown von Genen stehen Morpholino-Antisense-Oligonukleotide (Nasevicius und Ekker, 2000) und siRNA (Dodd et al., 2004; Liu et al., 2005) zur Verfügung, ebenso können Gene durch Injektion von RNA oder DNA überexprimiert werden. Dies ermöglicht sowohl die ektopische Expressierung von Fusionsproteinen, Knockdown durch dominant negative Proteine, als auch ein Heraustitrieren der endogenen Proteine durch mutante Versionen.

1.2 Augenentwicklung als zellbiologisches Modell für die Entwicklung des Zentralnervensystems

Die Retina ist nicht nur dazu geeignet, die visuelle Signaltransduktion zu untersuchen, sondern bietet als relativ klar strukturiertes und abgeschlossenes System des Zentralnervensystems die Möglichkeit, die Mechanismen neuronaler Zellen/Strukturen in Entwicklung und Funktion zu untersuchen. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte *cb1*-Mutante weist starke Defekte in der Augenentwicklung auf und bietet sich daher für die Untersuchung der Neurogenese in der Retina an.

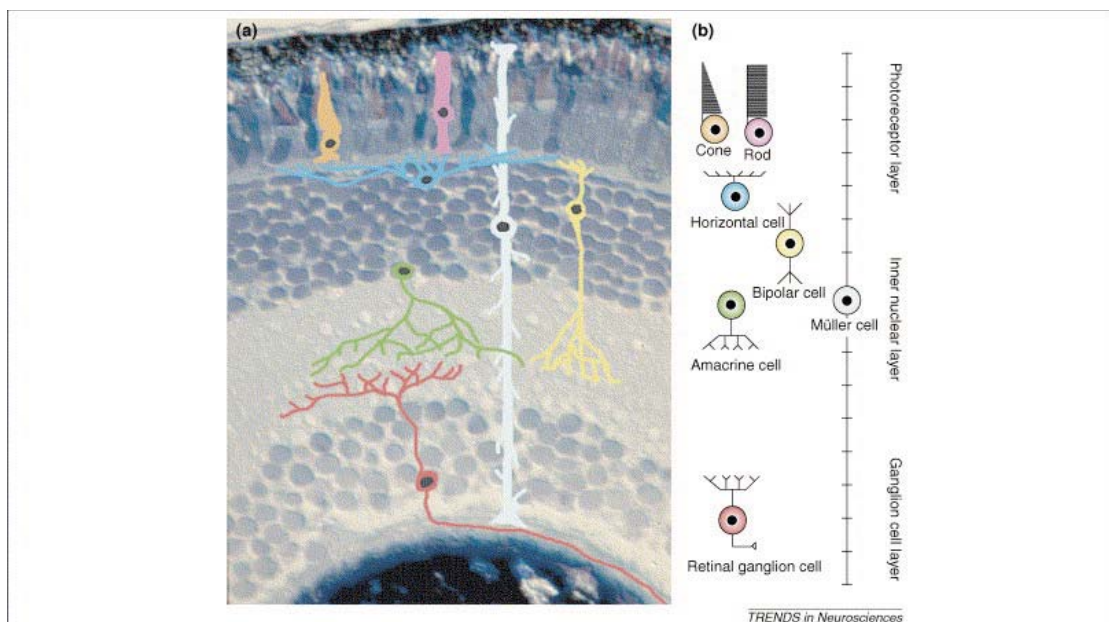


Abb. 3: Die Schichtung der Zebrafisch-Retina (aus Cayouette et al., 2006)

Die Retina des Zebrafischs besitzt die gleiche Schichtung und die gleichen Zelltypen wie die anderer Vertebraten. Sie besteht aus drei Schichten, in denen Zellkerne liegen, und zwei dazwischen liegenden plexiformen Schichten (Dowling, 1987). Die äußerste Zellschicht bilden die Fotorezeptoren (Abb. 3). Sie nehmen die optischen Reize auf und wandeln sie in elektrische Signale um. Die Fotorezeptor-Schicht (Abb. 3, Photoreceptor Layer, PRL) besteht aus Stäbchen für das Dämmerungssehen (Rods) und Zapfen für die Farbwahrnehmung (Cones). Ihre Axone leiten die Reize über die äußere Plexiforme Schicht (Outer Plexiform Layer, OPL) zur inneren Zellkernschicht (Abb. 3, Inner Nuclear Layer, INL) weiter, in der die Zellkörper der horizontalen, bipolaren und amakrinen Zellen liegen. Dort werden die Reize verarbeitet und über die innere Plexiforme Schicht (Inner Plexiform Layer, IPL) zur Ganglienzellschicht (Abb. 3, Ganglion Cell Layer, GCL)

nahe der Linse weitergeleitet. Die Axone der Ganglienzellen bilden den Sehnerv und verbinden die Retina mit dem visuellen Cortex. Die Müller-Glia-Zellen durchspannen die gesamte neuronale Retina.

Die Entwicklung des Auges beginnt mit der Bildung der Augenbläschen im Bereich der cranialen Neuralleiste, die nach 1,5 hpf sichtbar werden (Schmitt und Dowling, 1994). Diese wachsen aus und stülpen sich ein. Im Gegensatz zu den meisten anderen Vertebraten besitzen Fische kein Neuralrohr, sondern einen soliden Neuralkiel. Daher kann man auch nicht von Augenvesikeln, sondern eher von Augenlappen (optic lobes) sprechen, die sich aus den Augenbläschen entwickeln. Gleichzeitig wird im darüber liegenden Ektoderm die Entwicklung der Linse induziert. Die Augenbecher sind nach 24 hpf voll entwickelt und bestehen aus einer äußeren Zellschicht, die das Retinale Pigment Epithel (RPE) bildet, und den innen liegenden Zellen, die sich zur neuronalen Retina entwickeln (Schmitt und Dowling, 1994). Zu diesem Zeitpunkt hat sich auch die Linse vom Ektoderm abgeschnürt und liegt frei im Augenbecher.

Anschließend beginnt die Differenzierung der Zellen der neuronalen Retina. Die ersten postmitotischen Ganglienzellen finden sich nach 30 hpf im ventronasalen Teil der Retina (Nawrocki et al., 1985). Die Welle der Retinogenese setzt sich kreisförmig nach dorsonasal und anschließend nach ventrotemporal fort (Hu und Easter, 1999). Nach 36 hpf sind die Rudimente der Ganglienzellschicht in histologischen Schnitten sichtbar. Nach 43 bis 48 Stunden werden die ersten Fotorezeptoren postmitotisch und nach 60 hpf schließlich haben 90 % aller Neuronen der zentralen Retina den Zellzyklus verlassen (Malicki, 1999). Die Müller-Glia-Zellen schließlich verlassen als letzte den Zellzyklus (Ohnuma und Harris, 2003).

Die Mitosen finden immer an der apikalen Oberfläche der neuronalen Retina (neben dem RPE) statt. Die Zellkerne wandern zunächst in Richtung RPE, ziehen ihre Plasma-Fortsätze ein, durchlaufen die Mitose und begeben sich erst nach der Teilung zu ihrem Bestimmungsort (Abb. 4). Dieses Verhalten wird interkinetische nukleare Migration genannt (Hayes und Nowakowski, 2000; Ueno et al., 2006; Willer et al., 2005).

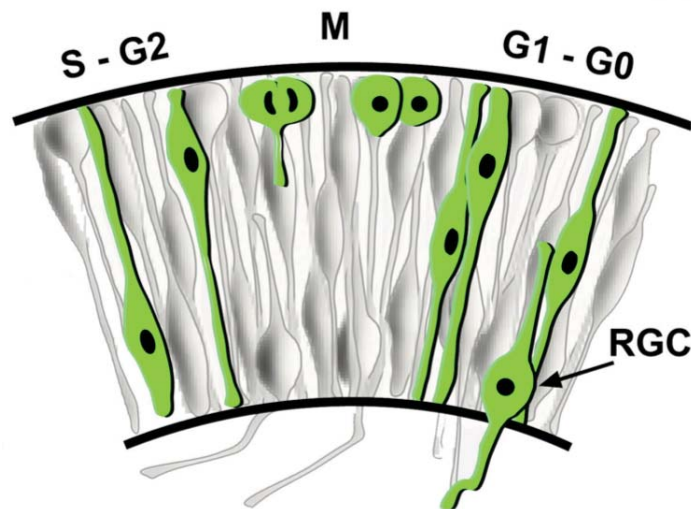


Abb. 4: Interkinetische nukleare Migration (aus Poggi et al., 2005). Die Zellkerne der neuronalen Retina wandern während der G2-Phase zur apikalen Oberfläche der Retina, ziehen ihre Fortsätze ein und teilen sich dort während der Mitose (M). Danach bilden sie neue Fortsätze (G1-Phase). Postmitotische Zellen wie Retinale Ganglienzellen (RGC) wandern anschließend an ihren Bestimmungsort (G0-Phase).

Die postmitotischen Zellen benötigen unterschiedlich lange, bis sie ihre speziellen Merkmale ausgebildet haben und ausdifferenziert sind. Die Ganglienzellen scheinen sehr schnell zu spezifizieren, während bipolare Zellen erst eine Weile nach der letzten Mitose ihre Charakteristika ausgebildet haben (Alexiades und Cepko, 1997; Waid und McLoon, 1998). Am Ende des dritten Tages sind alle Zelltypen vorhanden, in Schichten organisiert, die Photorezeptoren haben ihre äußeren Segmente gebildet und die Ganglienzellen ervernieren das optische Tectum (Easter und Nicola, 1996).

Der Zebrafisch hat ein ausgeprägtes Farbsehen und seine Retina eine hohe Dichte an Stäbchen. Sie ist somit der menschlichen Retina ähnlicher als die der Nagetiere, deren Übergang zur nächtlichen Lebensweise sich auch genetisch widerspiegelt. So ist z. B. das retinale Guanylat-Zyklase aktivierende Protein GCAP3 bei Menschen und Zebrafischen in den Zapfen exprimiert, aber nicht bei Mäusen (Imanishi et al., 2002). Unterschiede bestehen allerdings in der Art der Zapfen. Während bei Menschen Rezeptoren für Blau, Grün und Rot vorhanden sind, hat der Zebrafisch zusätzlich UV-Rezeptoren (Larison und Bremiller, 1990).

Im Gegensatz zur neuronalen Retina der Menschen wächst sie bei Fischen ein Leben lang weiter. Im Randbereich der Retina, der an die *Zonula ciliaris* grenzt, der so genannten Ciliary Marginal Zone, (CMZ), laufen ständig Mitosen ab und Zellen wandern kontinuierlich in die verschiedenen Schichten der Retina ein (Marcus et al., 1999). Am äußeren Rand sitzen multipotente, retinale Stammzellen, die zur Retina hin Zellen abgeben, die sich weiter teilen. Diese schnell proliferierenden Vorläufer-Zellen verlieren

ihr Potenzial schrittweise, verlassen schließlich den Zellzyklus und differenzieren zu den verschiedenen Zelltypen der Retina (Abb. 5).

Neueren Erkenntnissen zufolge haben auch Müller-Glia-Zellen neurogenetisches Potenzial (Bernardos et al., 2007). Ihre Zellkerne wandern zur apikalen Oberfläche und treten wieder in den Zellzyklus ein, wenn z. B. Photorezeptoren apoptotisch werden.

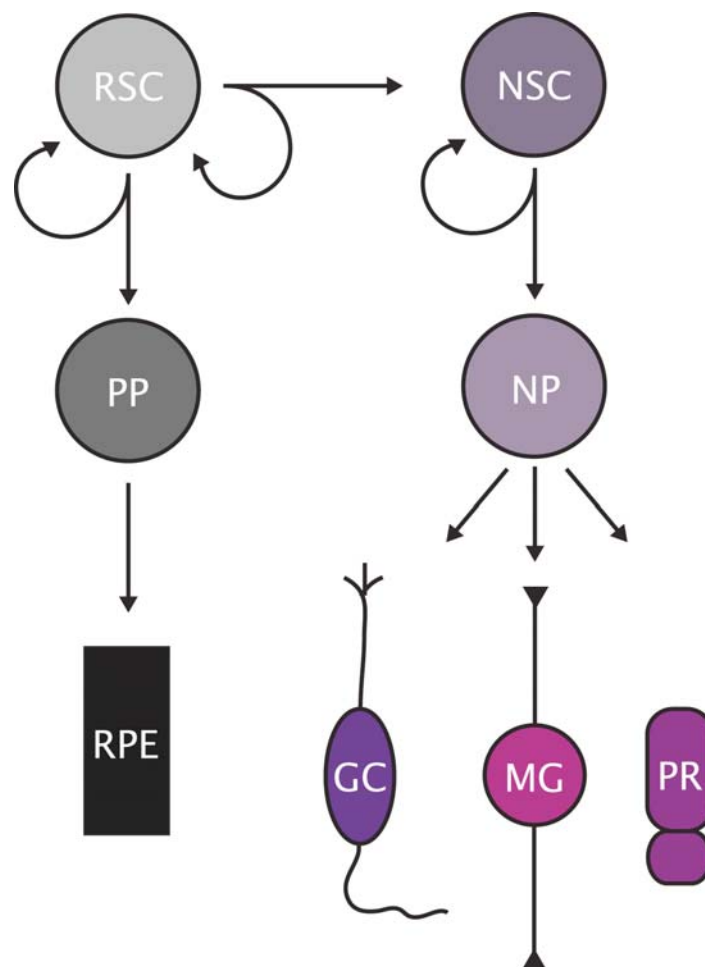


Abb. 5: Zellteilung in der Ciliary Marginal Zone und Retinale Stammzellen (Nach (Wehman et al., 2005)). RSC: Retinale Stammzelle, PP: Pigmentierte Vorläuferzelle, RPE: Retinales Pigmentepithel, NSC: Neuronale Stammzelle, NP: Neuronale Vorläuferzelle, GC: Ganglienzelle, MG: Müller-Glia, PR: Photorezeptor. Erläuterungen im Text.

Die Entwicklung der Retina im Zebrafisch weist viele Gemeinsamkeiten mit der Entwicklung beim Menschen auf und stellt damit ein exzellentes Modell zur Erforschung von genetischen und zellbiologischen Grundlagen diverser Augenerkrankungen dar. Darüber hinaus bietet die Entwicklung der Retina die Möglichkeit, an einem einfachen System neurobiologische Vorgänge zu untersuchen, welche Einsicht in die Vorgänge in den komplizierteren Strukturen des Zentralnervensystems ermöglichen.

1.3 Positionale Klonierung von Zebrafisch-Mutationen

Der Zebrafisch ist auf Grund seiner guten genetischen Voraussetzungen der einzige Vertebrat, der in größerem Umfang für das Screening und positionale Klonierung (positional cloning), das in dieser Arbeit angewandt wurde, verwendet wird.

Zur Identifizierung von Genen, die für normale und pathologische Prozesse in Organismen verantwortlich sind, ist die so genannte Vorwärts-Genetik (forward genetics) eine oft angewendete Methode. Hierbei werden spontane oder induzierte Mutationen mit Hilfe der Genetik gesucht und die mutierten Gene, die für den beobachteten Phänotyp verantwortlich sind, anschließend identifiziert. Einige Gene können auf Grund von bekannten Mutanten anderer Organismen oder von Genen, die im gleichen Signalkettenweg (pathway) aktiv sind, schnell "erraten" werden. Ist kein Kandidatengen vorhanden, muss die genomische Region durch systematische genetische Kartierung (mapping) bestimmt und nach Kandidatengenen gesucht werden - das so genannte positionale Klonieren.

1.3.1 Genetisch gleiche, stabile Linien

Eine erste wichtige Voraussetzung für das positionale Klonieren sind genetisch stabile Stammlinien, deren Individuen genetisch so ähnlich wie möglich sind, die zu anderen Linien aber auf der Ebene der nicht kodierenden Sequenz möglichst große Unterschiede aufweisen. Dies ist notwendig, damit bei dem für das genetische Kartieren notwendigen Auskreuzen die DNA durch spezifische Marker den Stämmen zuzuordnen ist.

Beim Zebrafisch existieren mehrere genetisch stabile Stämme, die sich unterschiedlich stark unterscheiden (Johnson und Zon, 1999). Dazu gehören SJD, TU, AB, IN, WIK und einige andere. Die Individuen eines Stammes sind jedoch nicht vollständig genetisch gleich und die Stämme sind auch nicht einfach aufrecht zu erhalten, da leicht das Verhältnis der Geschlechter außer Kontrolle gerät oder Mutationen die Lebensfähigkeit beeinflussen.

Im Gegensatz zu *Drosophila* fehlen genetische Stämme, welche durch Balancer-Chromosomen eine homologe Rekombination verhindern, um stabile mutante Linien zu halten. So existieren auch keine Linien, die durch sichtbare Marker die Analyse der genetischen Kopplung erleichtern.

1.3.2 Mutagenese

Da die Rate der spontan auftretenden Mutationen nicht sehr hoch ist wurden in der genetischen Forschung schon lange Methoden angewandt, um Mutationen zu induzieren. Neben ionisierender Strahlung, die eine sehr hohe Rate verschiedener Mutationen (von Punktmutationen bis zu großen Deletionen und Translokationen) hervorrufen können (Chakrabarti et al., 1983; Walker und Streisinger, 1983), wurden chemische Mutagene gefunden, die eine geringere Rate von Punktmutationen hervorrufen. Dies hat den Vorteil, dass nur wenige Mutationen pro Familie auftreten und oft nur eine Mutation ein Gen betrifft und einen Phänotyp bewirkt. Beim Zebrafisch war hier vor allem die Mutagenese mit Ethylnitrosourea (ENU) erfolgreich und wurde auch in den beiden großen Screens von Boston und Tübingen angewandt (Driever et al., 1996; Haffter und Nüsslein-Volhard, 1996; Mullins et al., 1994; Solnica-Krezel et al., 1994).

Tab. 1: Mapping Panels für den Zebrafisch (nach zfin.org)

Name	Typ	Anzahl der Marker	Labor
An integrated map of the zebrafish genome (ZMAP)	Computer-generiert	30566	J. Postlethwait
Goodfellow T51 (Tübingen Map)	Radiation Hybrid	14989	R. Geisler, Y. Zhou
Loeb/NIH/5000/4000 (LN54)	Radiation Hybrid	4192	I. Dawid
Heat shock (HS)	Meiotisch	3888	J. Postlethwait, W. Talbot
Boston MGH Cross (MGH)	Meiotisch	3881	M. Fishman
Mother of Pearl (MOP)	Meiotisch	676	J. Postlethwait
Gates et al (GAT)	Meiotisch	383	W. Talbot

Genetische Karten repräsentieren die Position von bekannten Markern relativ zueinander. Für die meiotischen Karten wurden Marker auf Grund der Häufigkeit ihrer gemeinsamen Vererbung in eine Reihenfolge gebracht. Liegen zwei Marker auf unterschiedlichen Chromosomen, ist das Muster ihrer Vererbung miteinander zufällig. Liegen sie auf dem gleichen Chromosom, sind sie genetisch gekoppelt und können nur durch homologe Rekombination (Crossing Over) voneinander getrennt werden. Je häufiger zwei Marker gemeinsam vererbt werden, desto näher liegen sie beieinander. Für die Generation der meiotischen Karten (Tab. 1) wurden anfänglich Microsatellite-Marker verwendet. Später wurden immer mehr ESTs (Expressed Sequence Tags), Gene etc. hinzugefügt. Neben den

meiotischen Karten existieren Radiation Hybrid-Karten (Tab. 1). Sie wurden anhand von Fusionen letal bestrahlter Zebrafisch-Zellen mit Hamster- oder Mauszellen erstellt. Hier wurde im Gegensatz zur homologen Rekombination der meiotischen Karten das Potenzial der Strangbrüche durch Strahlung ausgenutzt, um eine Kopplung der Marker zu untersuchen (Postlethwait et al., 1994).

1.3.3 Marker und ihre Auswertung

Auf den genetischen Karten sind mittlerweile mehrere Tausend Marker verankert, die für das positionale Klonieren verwendet werden können. Marker sind Sequenzen, die bei verschiedenen Stämmen polymorphisch (unterschiedlich) sind, und dadurch detektiert werden und zu anderen Markern oder Genen in Relation gebracht werden können. Hierfür stehen verschiedene Typen von Markern zur Verfügung. Am einfachsten anzuwenden sind SSLP-Marker. Simple Sequence Length Polymorphisms (SSLPs) sind Polymorphismen, die einfach durch PCR und Gelelektrophorese ausgewertet werden können. Die unterschiedliche Länge beruht meist auf Misalignment von Microsatellite-DNA-Repeats während der Meiose. Wesentlich schwieriger auszuwerten sind Single Strand Conformation Polymorphisms (SSCPs). Auf Grund von Unterschieden in der DNA-Sequenz, die oft nur aus einer Base bestehen, kann die per PCR amplifizierte DNA als Einzelstrang unterschiedliche Konformationen annehmen, die auf Polyacrylamid-Gelen bei bestimmten, individuell unterschiedlichen Konditionen (Puffer, Temperatur, Spannung, etc.) unterschiedlich schnell laufen. Daneben besteht die Möglichkeit, Polymorphismen, die Schnittstellen für Restriktionsenzyme generieren oder verändern, zu verwenden oder die polymorphen DNA-Abschnitte zu sequenzieren.

Neben den bereits bekannten Markern können bei Bedarf eigene Marker generiert werden, wenn die genomische Sequenz der fraglichen Region bekannt ist. Dazu wird auf der gegebenen genomischen DNA nach Sequenzen gesucht, die Microsatellite-Repeats enthalten. Diese werden auf den beiden verwendeten Genotyp-Stämmen auf Unterschiede getestet und ausgewertet.

1.3.4 Physikalische genomische Librarys

Um letztendlich genomische Sequenz untersuchen zu können, die zwischen den am nächsten gelegenen bekannten Markern liegt, ist es notwendig, die DNA physikalisch zugänglich zu machen. Dafür wird die genomische DNA mit Restriktionsenzymen geschnitten und in Plasmide eingefügt, die dann in passende Zellen transformiert werden, um sie dort zu vervielfältigen und aufbewahren zu können. Hierfür stehen verschiedene Systeme zu Verfügung, von denen künstliche Bakterien-, Hefen- und Phagen-Chromosomen (BACs, YACs, PACs) sowie Cosmide und Fosmide die gebräuchlichsten sind. Die resultierenden DNA-Librarys können dann mit Hilfe von PCRs gescreent

werden und so die relevanten Klone identifiziert und zur weiteren Analyse verwendet werden. Diese Methode hat den Vorteil, dass sehr große Stücke genomischer DNA zur Verfügung stehen. Die kommerziell erhältlichen Zebrafisch-Librarys und deren Ursprungs-DNA sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Tab. 2: Genomische Zebrafisch-DNA-Librarys

Name	Abkürzung	DNA	Anzahl der Klone	Durchschnittliche Größe	Redundanz
CHORI-211 BAC library	zC	Tübingen, Testes	105 907	165 kb	10
Daniokey BAC library	zK	"	105 064	175 kb	10
Daniokey Pilot BAC library	zKp	"	11 808	130 kb	1
CHORI-73 BAC library	zH	Tübingen, ganzes Tier	33 408	110 kb	N/A
RPCI-71 BAC library	bZ	Tübingen, adult gemischt	33 408	85 kb	17
BUSM1 PAC library	dZ	AB, Blutzellen	104 064	115 kb	7
ZFISHFOS Fosmid library	-	Tübingen, embryonale DNA	269 280	40 kb	6
CHORI-1073 Fosmid library	-	Tübingen, ganzer Fisch	183 168	N/A	N/A

Hat man einen Klon identifiziert, auf dem ein der Mutation nahe gelegener Marker vorhanden ist, kann der Klon von den Enden her ansequenziert werden. Wird ein Polymorphismus identifiziert, kann er als Marker verwendet werden, und so festgestellt werden, in welcher Richtung die gesuchte Mutation liegt. Mittels der bekannten Sequenz kann nun der nächste Klon identifiziert werden. Dieser so genannte BAC-Walk wird so lange fortgesetzt, bis man einen Klon identifiziert hat, auf dem die Mutation liegen muss. Diese Methode ist sehr aufwändig, und kann, da ein großer Teil der genomischen DNA-Librarys bereits sequenziert ist, immer häufiger vermieden werden, indem man polymorphe Marker auf der bekannten Sequenz identifiziert und analysiert.

1.3.5 Genom-Sequenzierung

Im Februar 2001 hat das Sanger Institute begonnen, das Genom des Zebrafischs zu sequenzieren. Dabei werden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt. Zum einen werden die vorhandenen BAC Libraries sequenziert. Diese Strategie ergibt lange, qualitativ hochwertige DNA-Sequenzen, dauert aber relativ lange. Zusätzlich wurden Plasmid und Fosmid libraries generiert, die nur kleine Inserts haben. Diese Strategie wird Whole Genome Shotgun Sequencing genannt (http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/).

Das Zebrafisch-Genom wird auf eine Größe von 1,6 bis 1,7 Gb geschätzt und wird durch die vorhandenen BAC-Library Sequenzen mehr als 36 mal abgedeckt. Von den beiden größten Libraries, CHORI-211 und Daniokey, wurden Fingerprints durch den Verdau mit HindIII angefertigt und deren Elektrophorese-Bandenmuster mit Hilfe der Software IMAGE (<http://www.sanger.ac.uk/software/image/>) und FPC (<http://www.sanger.ac.uk/Software/fpc/>) zu einer Karte zusammengestellt. Anhand der erhaltenen Contigs werden Klone ausgewählt, die anschließend sequenziert werden. Die Fingerprint Contigs, die fertigen BAC-Sequenzen und der Status der zum Sequenzieren ausgewählten BACs ist abrufbar unter http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/WebFPC/zebrafish/large.shtml. Die fertig sequenzierten BACs werden manuell auf die Richtigkeit der maschinell erstellten Annotationen überprüft und sind auf Vega (http://vega.sanger.ac.uk/Danio_rerio/index.html) abruf- und analysierbar. Dieses Projekt ist sehr arbeitsintensiv und noch nicht sehr weit fortgeschritten. Die Montage erfolgt auf der Basis der FPC-Daten.

Für das Whole Genome Shotgun Sequencing wurde eine Plasmid Library mit einer Insert-Größe von 2-10 kb und eine Fosmid Library mit einer durchschnittlichen Insert-Größe von 40 kb aus Tübingen Embryonen generiert und sequenziert. Die resultierenden Traces sind abrufbar und mit SSAHA (einem sehr schnellen Tool zum Suchen fast identischer DNA-Sequenzen) durchsuchbar (<http://trace.ensembl.org>).

Sämtliche Daten aus den beiden Sequenzierungs-Strategien werden zusammen mit allen weiteren vorhandenen Sequenzen wie bekannten Genen, cDNAs und ESTs, sowie Markern von Mapping Panels mit dem Phusion Assembler integriert und montiert (Mullikin und Ning, 2003). Diese Assemblys werden anschließend mit Ensembl maschinell kommentiert. Sie sind dort (http://www.ensembl.org/Danio_rerio/index.html) abrufbar. Ensembl ist ein Software-System vom European Bioinformatics Institute EBI und dem Sanger Center, das automatische Genom-Annotationen von ausgewählten eukaryotischen Genomen erstellt und zugänglich macht (Hubbard et al., 2002; Hubbard et al., 2007).

1.3.6 Kreuzungsschema für das positionale Klonieren

Um Mutationen durch positionales Klonieren identifizieren zu können, muss der Stamm, der die Mutation trägt (Mutationsstamm), mit einem genetisch anderen Stamm (Referenzstamm) ausgekreuzt werden.

Dazu wird ein Tier, das die Mutation heterozygot trägt (homozygote Träger sind meist letal) mit einem Tier eines anderen Stammes gekreuzt (Abb. 6, Parentalgeneration). Deren Nachkommen (Abb. 6, F1) tragen jeweils zur Hälfte das Erbgut des Mutations- und des Referenzstammes. Sie können heterozygot mutant sein. Träger der Mutation werden untereinander verpaart (Incross). Deren Nachkommen (Abb. 6, F3) sind zu einem Viertel homozygot mutant. Diese Tiere zeigen den mutanten Phänotyp und werden als Embryonen gesammelt. Ihre DNA wird zur Lokalisation der Mutation verwendet.

Da während der Meiose in der F2-Generation homologe Rekombination (Crossing Over) stattfindet (Abb. 6), sind die Tiere der F3-Generation nicht immer genotypisch Mutationsstamm. Sie können in Teilen beider Chromosomen DNA des Referenzstammes erhalten haben (Abb. 6). Bekannt ist aber, dass die Mutation selbst immer im genetischen Background vom Mutationsstamm liegt. Sammelt man nun die mutanten Embryonen, kann man sich sicher sein, dass ihre DNA rund um die Mutation dem Mutationsstamm entpringt. Je näher ein untersuchter Marker an der Mutation liegt, desto seltener findet man DNA vom Referenzstamm, da die Wahrscheinlichkeit für Crossing Over mit der Entfernung zur Mutation sinkt.

Diesen Umstand macht man sich zu Nutze, indem man polymorphe Marker auf homozygot mutanten Embryonen testet und die Anzahl der Embryonen zählt, die DNA des Referenzstammes aufweisen. Diese Embryonen nennt man Rekombinanten. Findet man viele, liegt die Marker-Sequenz weiter von der Mutation entfernt; findet man wenige, liegt sie näher bei der Mutation. Findet man für zwei Marker unterschiedliche Rekombinanten, kann man davon ausgehen, dass die Marker auf verschiedenen Seiten der Mutation liegen. Die Anzahl der Rekombinanten stellt gleichzeitig ein genetisches Mass des Abstandes zwischen Mutationen und verwendeten genetischen Markern dar.

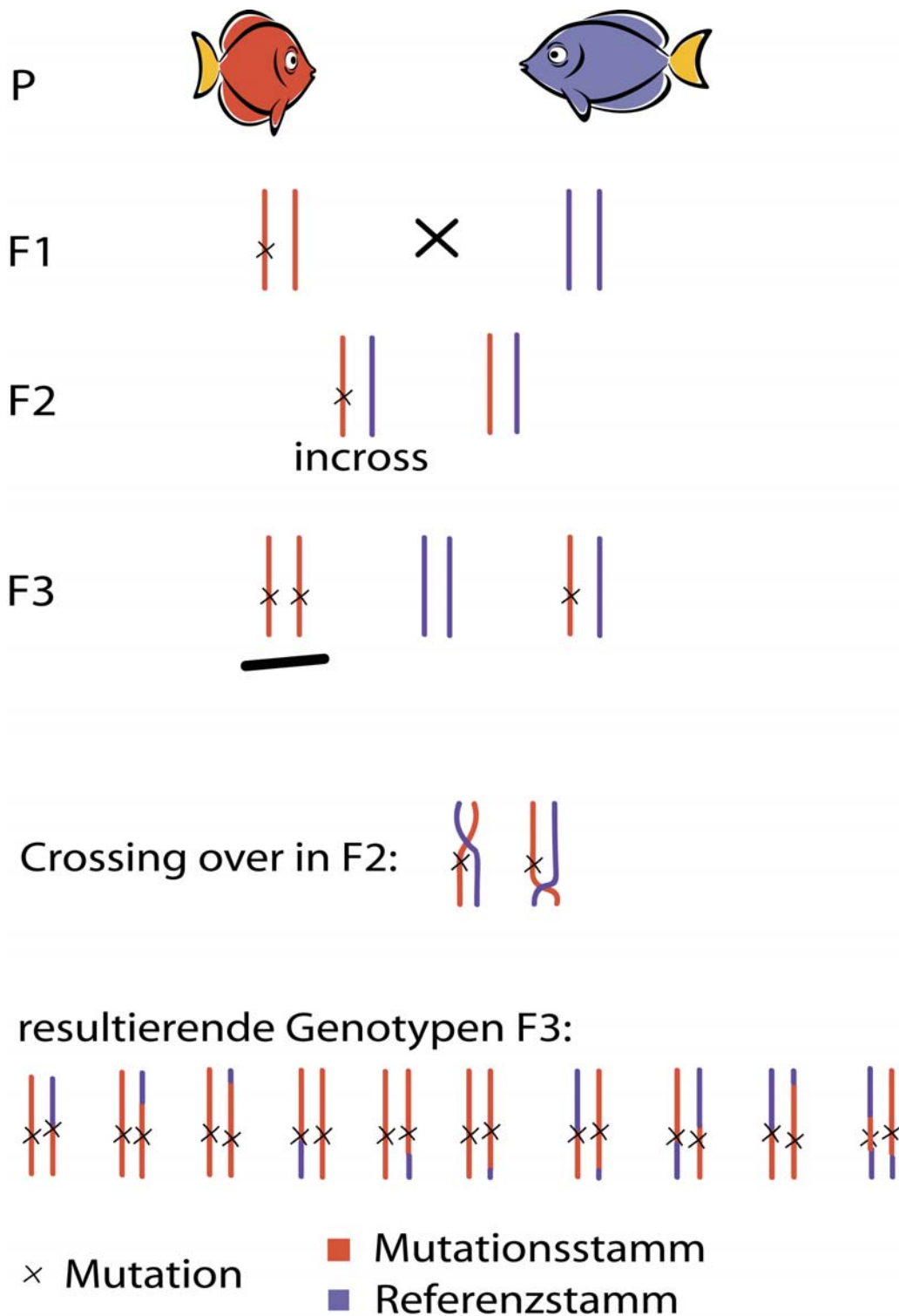


Abb. 6: Kreuzungsschema für positionales Klonieren (nur das betroffene Chromosom wird gezeigt). Erläuterungen siehe Text.

1.4 Die Condensin-Komplexe und ihre Funktion während des Zellzyklus

1.4.1 Entdeckung der Condensin-Komplexe

Die Zellteilung erfordert auf molekularer Ebene die zeitlich geordnete Abfolge aller Prozesse, um zu gewährleisten, dass jede Tochterzelle genau einmal die gesamte Erbinformation erhält. Die mitotische Zelle hat dabei zwei mechanische Probleme: Erstens sind die DNA-Moleküle, verglichen mit der Größe der Zellen, extrem lang (bis zu mehreren Zentimetern) und zweitens sind die Schwesterchromatiden miteinander verbunden. Die eukaryotische Zelle muss für die Zellteilung die Chromosomen verdichten und die Schwesterchromatiden trennen, ohne die epigenetische Information zu ändern. Diese Funktion erfüllen die Proteine des Chromatins, die die DNA gleichzeitig restrukturieren und das Genom in bestimmten Entwicklungsstadien reprogrammieren können. In diesem Feld agieren auch die Condensin-Komplexe.

Der erste Condensin-Komplex ist durch biochemische Untersuchungen von *in vitro* kondensierten Spermien-Chromosomen in *Xenopus*-Ei-Extrakten entdeckt worden. Wenn Spermien-Chromosomen in diesem Extrakt inkubiert werden, trennen sich die Schwesterchromatiden, und kondensieren zu Chromosomen mit nur einem Chromatid aus nicht repliziertem, haploidem Chromatin. Die Gruppen von Mitchison und Hirano isolierten Proteine, die mit diesen Chromosomen assoziiert sind (Hirano et al., 1997; Hirano und Mitchison, 1994). Unter ihnen waren XCAP-B (Topoisomerase II) und XCAP-D1 (Xklp1, ein Kinesin-ähnliches Protein). Weitere 5 Proteine (XCAP-C, -D2, -E, -G und -H) bildeten einen Komplex, der Condensin genannt wurde (Abb. 7). Es zeigte sich, dass sowohl XCAP-E als auch XCAP-H bereits bekannt waren: XCAP-E war als ScII als Bestandteil des Chromosomen-Gerüsts identifiziert worden (Saitoh et al., 1994), und CAP-H war in der *Drosophila*-Mutante *barren* isoliert worden (Bhat et al., 1996). Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass Condensin in zwei unterschiedlichen Formen vorkommt: als Dimer aus XCAP-C und XCAP-E (den SMC-Untereinheiten [Structural Maintenance of Chromosomes]) mit einem Sedimentations-Koeffizienten von 8S, aber auch als 13S-Komplex mit den zusätzlichen Untereinheiten XCAP-H, XCAP-D2 und XCAP-G (Condensin I) (Hirano et al., 1997). Später wurde ein zweiter Condensin-Komplex entdeckt (Condensin II), der aus den gleichen SMC-Untereinheiten bestand, aber XCAP-H2, XCAP-D3 und XCAP-G2 enthielt (Ono et al., 2003; Yeong et al., 2003).

Parallel dazu wurden durch genetische Studien in *Schizosaccharomyces pombe* (Saka et al., 1994) und in *Saccharomyces cerevisiae* (Strunnikov et al., 1995) Genprodukte identifiziert, die für die Chromosomensegregation notwendig waren. Sie wurden mit *cut3* und *cut14* in *Schizosaccharomyces pombe* und als Smc2 und Smc4 in *Saccharomyces cerevisiae* bezeichnet. Die Primärstrukturen sowohl dieser Proteine als auch von XCAP-E/ScII und XCAP-C zeigten, dass sie alle zur SMC-Familie gehören (siehe unten). Auf Grund von Sequenz-

Vergleichen werden Smc2, ScII, cut14 und XCAP-E als homolog angesehen, so wie auch Smc4, cut3 und XCAP-C.

Ebenso fanden sich Condensin-Komplexe in den Bakterien *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli*, in Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*), bei Vögeln (*Gallus gallus*) und Menschen.

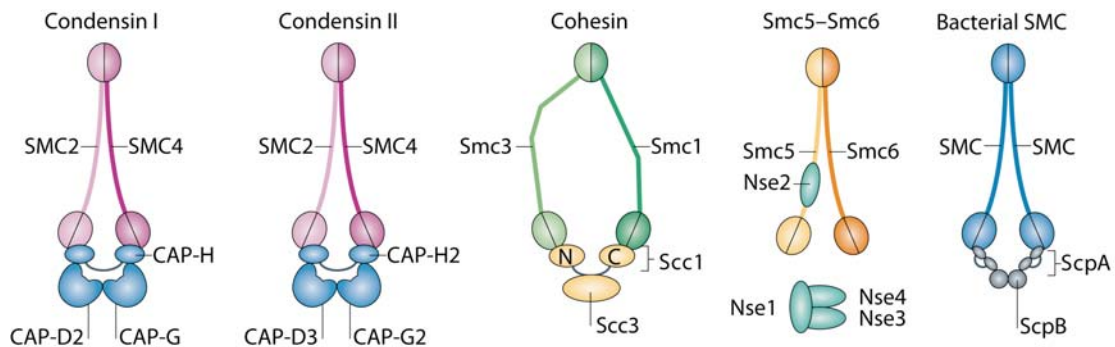


Abb. 7: SMC-Protein-Komplexe in Eukaryoten und Bakterien. Die in Metazoen vorkommenden Condensin I und II besitzen die gleichen SMC-Untereinheiten, SMC2 und SMC4, und unterschiedliche regulatorische Untereinheiten: eine Kleisin-Untereinheit (CAP-H oder CAP-H2) und zwei HEAT-Untereinheiten (CAP-G und CAP-D2 oder CAP-G2 und CAP-D3). Der eukaryotische Cohesin-Komplex besteht aus Smc1 und Smc3, sowie Scc1 (Kleisin) und Scc3 (HEAT). Ein weiterer, noch nicht benannter, Komplex besteht aus einem Smc5-Smc6-Dimer und mindestens 4 verschiedenen nicht SMC-Untereinheiten (Nse1-4). Der bakterielle SMC-Komplex in *B. subtilis* besteht aus einem SMC-Homodimer und zwei regulatorischen Untereinheiten (ScpA und ScpB). (Hirano, 2006)

1.4.2 Die molekulare Architektur der Condensin-Komplexe

Die beiden Condensin-Komplexe sind Pentamere aus zwei SMC- und drei nicht-SMC-Untereinheiten (Abb. 7).

SMC-Proteine sind zwischen 1000 und 1500 Aminosäuren lang, besitzen globuläre Domänen an N- und C-Enden (Walker A und Walker B-Motive), verbunden durch lange Peptid-Stränge, und in der Mitte eine Gelenk-(Hinge)Region. Durch intramolekulare Dimerisation bilden die SMC-Untereinheiten eine antiparallele Coiled-Coil-Struktur, so dass die beiden Walker-Domänen zusammen eine funktionelle ATPase bilden, die strukturell der anderer ABC-ATPasen entspricht (Hopfner et al., 2000; Hopfner und

Tainer, 2003; Lowe et al., 2001). Sie kommen nicht nur in den beiden Condensin-Komplexen vor, sondern auch in den sehr ähnlichen Cohesin- und SMC5/6-Komplexen.

Die 6 in Eukaryonten vorkommenden SMCs bilden Heterodimere (SMC2/SMC4, SMC1/SMC3, SMC5/SMC6), die an den Hinge-Regionen verbunden sind. Das einzige in Prokaryonten vorkommende SMC-Protein bildet ein Homodimer (Abb. 7).

SMC1 und SMC3 bilden zusammen das Gerüst für Cohesin, einem den Condensins sehr ähnlichen Komplex. SMC2 und SMC4 findet man in beiden Condensins. SMC5 und SMC6 sind Bestandteil eines weiteren Komplexes, der in der Chromosomen-Segregation während der Meiose und in DNA-Reparatur-Vorgängen eine Rolle zu spielen scheint (Pebernard et al., 2004).

Zusätzlich zu den SMC-Untereinheiten enthalten die Cohesin- und Condensin-Komplexe nicht-SMC-Untereinheiten, eine Kleisin-Untereinheit und 2 HEAT-Untereinheiten (Abb. 7). Die Kleisin-Proteine (abgeleitet vom griechischen *kleisimo*, Verschluss) binden sowohl an die SMC-Untereinheiten als auch an die HEAT-Proteine (Schleiffer et al., 2003). Die HEAT-Proteine (benannt nach ihrer auch in **H**untingtin, **E**longation Factor 3, **A**lpha-Subunit of Protein-Phosphatase 2A und **T**OR1 vorkommenden Domäne) binden nur an die Kleisin-Untereinheit (Abb. 7) (Andrade und Bork, 1995; Neuwald und Hirano, 2000).

Tab. 3: Condensin I Untereinheiten verschiedener Organismen (nach Hirano, 2005)

	SMC-Untereinheiten		Nicht-SMC-Untereinheiten Condensin I			Nicht-SMC-Untereinheiten Condensin II		
	SMC2	SMC4	Kleisin	HEAT	HEAT	Kleisin	HEAT	HEAT
<i>Xenopus laevis</i>	XCAP-E	XCAP-C	XCAP-H	XCAP-D2/ Eg7	XCAP-G	XCAP-H2	XCAP-D3	XCAP-G2
<i>Drosophila melanogaster</i>	SMC2	Gluon/ SMC4	Barren	CG1911	CG17054	CG14685	CG31989	
<i>Homo sapiens</i>	hCAP-E	hCAP-C	hCAP-H	hCAP-D2/ CNAP1	hCAP-G	hCAP-H2	hCAP-D3/ hHCP-6	hCAP-G2
<i>Caenorhabditis elegans</i> *	MIX-1	DPY27/ SMC4	DPY-26	DPY-28	(-)	KLE-2/ C29E4.2	HCP-6	F55C5.4
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Cut14	Cut3	Cnd2	Cnd1	Cnd3	(-)	(-)	(-)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Smc2	Smc4	Brn1	Ycs4p	Ycs5p/ Ycg1p	(-)	(-)	(-)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtCAP-E1/E2	AtCAP-C	AAC25941	CAB72176	BAB08309	At3g16730 .1	At4g15890 .1	At1g64960 .1
<i>Bacillus subtilis</i>	SMC	SMC	ScpA	ScpB		(-)	(-)	(-)
<i>Escherichia coli</i>	MukB		MukF	MukE				

*In *C. elegans* existiert neben dem Condensin-Komplex (der dem Condensin II mehr ähnelt) ein Condensin-verwandter Dosage Compensation Complex (DCC) als X-chromosomaler Dosis-Kompensations-Komplex, der statt SMC4 die Variante DPY27 sowie die Untereinheiten DPY-26 und DPY-28 enthält.

1.4.3 Die Funktion der Condensin-Komplexe

Condensin ist in zellfreien Extrakten und Hefen notwendig für die mitotische Chromosomen-Kondensation, in vielzelligen Organismen wurde jedoch beobachtet, dass die Abwesenheit von Komponenten des Condensin I zu normaler oder annähernd normaler Kondensation der mitotischen Chromosomen führt. In *Drosophila* wurde dies sowohl für die SMC-Untereinheiten (Coelho et al., 2003; Steffensen et al., 2001) als auch für die nicht-SMC-Untereinheiten beobachtet (Bhat et al., 1996; Dej et al., 2004; Jager et al., 2005; Oliveira et al., 2005; Savvidou et al., 2005). Auch in *C. elegans* und DT40-Zellen (Huhn) konnte eine vollständige (Hagstrom et al., 2002; Hudson et al., 2003; Kaitna et al., 2002) oder fast vollständige Kondensation (Vagnarelli et al., 2006) beschrieben werden. Teilweise wurde eine Verzögerung des Kondensationsprozesses festgestellt (Hagstrom et al., 2002; Hirota et al., 2004; Hudson et al., 2003; Kaitna et al., 2002; Maddox et al., 2006). Stattdessen zeigten sich massive Probleme bei der Segregation der Schwesterchromatiden (Bhalla et al., 2002; Coelho et al., 2003; Oliveira et al., 2005; Savvidou et al., 2005; Steffensen et al., 2001; Watrin und Legagneux, 2005), was auf Schäden in der Architektur

der Metaphase-Chromosomen hinweisen könnte. Dies wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass Chromosomen mit nicht funktionalem Condensin-Komplex weniger resistent gegenüber hypotonischem Schock sind (Hirota et al., 2004; Hudson et al., 2003; Oliveira et al., 2005).

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsobjekt

2.1.1 Die Zebrafisch-Mutante *creature from the black lagoon*

Die Mutante *creature from the black lagoon* stammt aus einem ENU-Mutagenesis-Screen und wurde von Herwig Baier, University of California, San Francisco, zur Verfügung gestellt. Sie hat die Allel-Nr. s3568.

2.1.2 Stämme, Haltung und Präparation

Die Zebrafische wurden in einem Aquariensystem mit Rezirkulation und verschiedenen Filtersystemen (UV-Filter, Mechanische-Filter, Bakterienmatten) (Schwarz Aquarienbau, Göttingen) gehalten. Das Wasser hatte eine Temperatur von 26-27 °C und einen pH-Wert von ca. 7. Die Zusammensetzung des Fisch-Wassers ist im Kapitel Lösungen und Puffer beschrieben.

Embryonen und Larven wurden bis zu einem Alter von 5 Tagen in Petrischalen in Egg-Water bei 28,5 °C (Inkubator) gehalten. Jungfische wurden bis zu einem Alter von 10 Tagen in Embryo-Water im Fischraum gehalten und anschließend an das Aquariensystem angeschlossen. Das Licht wurde automatisch von 22 bis 8 Uhr ausgeschaltet, damit eine gleichmäßige und pünktliche Ablage der Eier erfolgte. Das Futter bestand aus lebenden, zwei Tage alten, *Artemia nauplia* (Cysten von Aquaculture Supplies). Zusätzlich konnten übliche Futterflakes oder Cyclops-eeze (Argent) gegeben werden. Die Jungfische bekamen Biokyowa®, sehr fein gemahlenes Trockenfutter.

Als Wildtyp-Stämme wurden WIK und in Ausnahmefällen TüLF verwendet.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 DNA-Isolierung

2.2.1.1 Aus Embryonen

Isolierung genomischer DNA aus Einzelembryonen

In Methanol aufbewahrte Embryonen werden einzeln in 96er-PCR-Platten (hitzebeständig) sortiert und das restliche Methanol wird abpipettiert.

Zum Trocknen wird die Platte 15 min in einer offenen PCR-Maschine bei 70 °C inkubiert. (Nach diesem Schritt sind die Embryonen sehr leicht und fliegen schnell davon!)

Für den Verdau des Gewebes werden auf jeden Embryo 25 µL Proteinase-K-Lösung (1,7 mg/mL) gegeben, mit Klebefilm (hitzebeständig) versiegelt und in einer PCR-Maschine 4 h bei 55 °C inkubiert.

Bei 75 °C wird die Proteinase K für 10 min in der PCR-Maschine inaktiviert.

Anschließend werden 80 µL (für Embryonen ab 3 dpf) oder 40 µL (für jüngere Embryonen) ddH₂O pro Embryo zugegeben, die Platte versiegelt und bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.1.2 Aus adulten Tieren

Isolierung genomischer DNA aus adulten Tieren oder Finclips

Für die Isolierung von genomischer DNA aus adulten Tieren wird lediglich ein kleines Gewebestück (bis 3 × 3 mm) eingesetzt, dabei sollte darauf geachtet werden, dass keine Teile von Darm und Magen verwendet werden. Es ist auch möglich, von lebenden (mit Tricaine (Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate) anästhesierten) Tieren Teile der Flossen abzuschneiden und zur DNA-Isolierung einzusetzen (Finclips).

Das Gewebe wird über Nacht in 50-100 µL Proteinase K (1,7 mg/mL) in TE bei 55 °C verdaut, die Proteinase K anschließend bei 75 °C deaktiviert und 50-100 µL ddH₂O zugegeben.

2.2.2 RNA-Isolierung

RNA aus Embryonen wurde mit Trizol isoliert. Dazu wurden 10-50 Embryonen in 500 μL TRIZOL (Invitrogen) homogenisiert (durch Auf- und Ab-Pipettieren oder Ultraschall), 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit 100 μL Chloroform versetzt, 15 s geschüttelt, 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert und 15 min bei 2-8 °C und 12 000 \times g zentrifugiert.

Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und die RNA anschließend mit 250 μL Isopropanol für 10 min bei Raumtemperatur gefällt und 10 min bei 2-8 °C und 12 000 \times g zentrifugiert.

Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 500 μL 76 %igem Alkohol gewaschen und 5 min bei 7500 \times g zentrifugiert. Nachdem das Pellet kurz getrocknet wurde (es darf nicht austrocknen), wurde die RNA in 50-100 μL DEPC- H_2O aufgenommen und 10 min bei 55-60 °C und durch Auf- und Ab-Pipettieren gelöst.

2.2.3 Plasmid-Präparation (Miniprep)

Um Plasmid-DNA aus transformierten E. coli zu isolieren, werden 2 mL Bakterienkultur für 1 min bei 13 000 \times g zentrifugiert. Das Pellet wird in 100 μL Lösung 1 resuspendiert (Vortex), die Bakterien mit 200 μL Lösung 2 lysiert und die Proteine werden mit 150 μL Lösung 3 gefällt. Nach 5 min Zentrifugation bei 4 °C und 14 000 \times g wird der Überstand in ein neues Tube überführt und die DNA mit 1 mL Ethanol (100 %) gefällt. Nach der Zentrifugation (5 min, 4 °C, 14 000 \times g) wird das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20-50 μL dd H_2O aufgelöst.

Diese Methode ist schnell, billig und ergibt eine hohe Ausbeute an Plasmid-DNA, allerdings sind Reste von Protein und RNA enthalten.

Falls saubere DNA erforderlich war, wurde das QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) verwendet und laut Anleitung verfahren.

2.2.4 cDNA-Synthese

Für die reverse Transkription zur cDNA-Synthese wurde das Sensiscript RT Kit von Qiagen verwendet und laut Anleitung verfahren. Eingesetzt wurden:

Mix für die reverse Transkription

- 1 µL RNA
- 2 µL 10x Puffer
- 2 µL dNTP-Mix (0,5 mM für jedes dNTP)
- 2 µL random Primer (10 µM)
- 1 µL RNase Inhibitor
- 1 µL Sensiscript Reverse Transcriptase
- 1 µL RNase freies Wasser

2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion

Für die Standard-PCR wurde AmpliTaq®-Polymerase (Applied Biosystems) verwendet und laut Anleitung verfahren. Die Taq-Polymerase hat den Vorteil, dass sie Adenosin-Überhänge produziert und das Produkt gleich in Vektorsysteme wie das Topo TACloning Kit (Invitrogen) oder TACloning Kit (pGEM T easy, Promega) ligiert werden kann. Nachteile sind die relative Häufigkeit von Fehlern und die Schwierigkeit, sehr lange oder GC-reiche DNA-Fragmente zu amplifizieren.

Mix für die Standard-PCR

- 2,5 µL 10 x-Puffer
- 2,5 µL dNTPs (0,5 mM)
- 0,25 µL je Primer (50pmol/µL)
- 0,25 µL Taq-Polymerase
- 0,5 – 2 µL DNA-Lösung
- mit ddH₂O aufgefüllt auf 25 µL

Für spezielle Fälle können weitere Komponenten wie z. B. DMSO für Plasmid-DNA-Matrizen zugesetzt werden.

Wurde eine hohe Genauigkeit der Transkription benötigt oder wurden lange oder GC-reiche DNA-Matrizen oder suboptimale Primer eingesetzt, wurde die Phusion-Polymerase (HighFidelity PCR Kit, New England Biolabs) eingesetzt.

Die Phusion-Polymerase generiert jedoch keine Adenosin-Überhänge, so dass für die direkte Klonierung ein A-Tailing angeschlossen werden muss. Alternativ kann eine Blunt-End-Klonierung erfolgen oder es werden Primer mit Restriktionsschnittstellen eingesetzt, so dass das PCR-Produkt verdaut und ligiert werden kann.

Für die Amplifikation besonders langer Fragmente (>3000 bp) wurde das Expand High Fidelity PCR System (Roche) eingesetzt.

Für das Mapping wurde zu Beginn der Arbeiten statt kommerziell erhältlicher Taq-Polymerase und zugehörigem Puffer Taq-Polymerase, die von Petra Heere hergestellt wurde verwendet. Der Puffer wurde ebenfalls selbst hergestellt und bestand aus 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCL, 15 mM MgCl₂ und 0,1 % (w/v) Gelatine (autoklaviert).

2.2.6 A-tailing von PCR-Produkten

Um PCR-Produkte, die mit Polymerasen amplifiziert wurden, die keine Adenosin-Überhänge generieren, wurden diese durch kurze Inkubation mit Taq-Polymerase erzeugt. Dazu wurden 7 µL gereinigtes PCR-Produkt mit 1 µL dATP (10 ×), 1 µL Taq-Puffer und 1 µL Taq-Polymerase gemischt und 25 min bei 70 °C inkubiert.

2.2.7 Dephosphorylierung von Vektoren

Zur Vermeidung der Selbstligation von Vektoren während der Ligation wurden mit Hilfe der Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP) die Phosphatreste nach beiliegender Anleitung entfernt.

2.2.8 Restriktionsverdau

Zum Überprüfen von Ergebnissen wurde 2 µL DNA mit 2 µL entsprechendem Puffer und evtl. BSA und Triton mit 0,5 µL pro Enzym (aufgefüllt auf 20 µL mit ddH₂O) für mindestens eine Stunde bei der für die Enzyme optimalen Temperatur inkubiert.

Für Klonierungen wurde entsprechend mehr eingesetzt, für die Isolierung von Vektor-Backbones weniger.

2.2.9 Ligation

Für die Ligation von PCR-Produkten mit Adenosin-Überhang wurde das pGEM T easy Vektor-System verwendet und laut Anleitung verfahren.

Für Ligationen mit Blunt oder Sticky Ends wurde das Rapid DNA Ligation Kit (Fermentas) verwendet.

2.2.10 Transfomation von chemisch kompetenten Zellen

Für die Transformation wurden die Zellen (aliquotiert, bei -80 °C aufbewahrt) auf Eis aufgetaut, 3-10 µL Ligationsansatz hineingegeben und zunächst für 20-30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen einem Hitzeschock von 50 s bei 42 °C ausgesetzt und 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 100-300 µL vorgewärmtem LB-Medium ohne Antibiotikum wurden die Zellen ca. 1 h (oder weniger) langsam bei 37 °C geschüttelt, auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C wachsen gelassen. Verwendet wurden DH5α Chemical Competent Cells (Promega) oder die in dem verwendeten Kit mitgelieferten Bakterien.

2.2.11 Gelelektrophorese

2.2.11.1 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach PCR oder Restriktionsverdau oder um die Qualität von synthetisierter RNA zu überprüfen wurde 1-2 % Agarose (Cambrex) in TBE-Puffer verwendet. Der Laufpuffer war ebenfalls TBE.

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten von weniger als ~50 bp Unterschied wurde 2 % High Melting/Small Fragment Agarose (Cambrex) in TBE angewendet.

Angefärbt wurde die DNA durch Zugabe von 10 µL Ethidiumbromid auf 100 mL Gel.

Als Längenmarker wurden GeneRuler 100 bp Ladder plus, GeneRuler 1 kb DNA Ladder plus oder Lambda DNA/HindIII Marker (alle Fermentas) verwendet.

Für die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit von Qiagen oder dem Jetsorb (Genomed) laut Anleitung verfahren.

2.2.11.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese für SSCPs ist dort beschrieben; die Protein-Gelelektrophorese ist im Kapitel 2.3.1.1 beschrieben.

2.2.12 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden bei InVitek (Berlin) oder von J. Richter oder P. Heere in Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen des MDC vorgenommen.

2.2.13 Simple Sequence Length Polymorphism Analyse

Mit Primer-Paaren für SSLP-Marker, die auf verschiedenen genetischen Backgrounds unterschiedlich lange Produkte liefern, wurden PCR-Reaktionen auf genomischer DNA von homozygot mutanten Embryos gemacht und auf einem Agarose-Gel analysiert. Je mehr Embryonen die Bande des eingekreuzten Fisch-Stammes zeigen, desto weiter entfernt liegt der Marker von der Mutation entfernt.

2.2.14 Single Strand Conformation Polymorphism Analyse

Mit Primer-Paaren für eine Sequenz, die für zwei genetische Backgrounds Unterschiede aufweist – ein oder wenige Basenpaare – wurde eine PCR-Reaktion auf genomischer DNA von homozygot mutanten Embryonen gemacht. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,6 µL Denaturierungs-Lösung auf 5,4 µL PCR-Reaktion und 2,4 µL Loading Dye und Inkubation bei 85 °C (10 min) denaturiert. Auf einem Acrylamid-Gel (vorgefertigt, verschiedene Firmen) wurde die DNA analysiert. Die genauen Konditionen müssen für jeden Marker individuell ermittelt werden, damit eine eventuell unterschiedliche Konformation der Einzelstränge auf dem Gel sichtbar gemacht werden kann. Begonnen wurde mit einer Temperatur von 16 °C, einer Spannung von 200 V und TBE-Puffer. Falls keine Unterschiede zu sehen waren, wurde die Temperatur (z. B. 5 °C, 25 °C) geändert, die Gele mit einer sehr niedrigen Spannung laufen gelassen (z. B. 20 V), höhere Gel-Konzentrationen verwendet (15 oder 20 %), andere Puffer verwendet, Glycerol oder andere hydrophile Additive hinzugegeben, die Denaturierung modifiziert oder durch andere Primer-Paare die Fragment-Länge verändert.

Die DNA auf dem Gel wurde durch eine Silber-Färbung (DNA Silver Staining Kit, Pharmacia Biotech) sichtbar gemacht.

2.2.15 BAC-Library-Screen

Um zu untersuchen, auf welchem BAC sich eine bestimmte Sequenz befindet, wurden mit geeigneten Primern PCR-Reaktionen auf den BAC-DNA-Pools gemacht und auf einem Agarose-Gel analysiert.

2.2.16 Verdau von DNA-Matrizen für Sense- oder Anti-Sense-RNA-Transkription

Für die RNA-Transkription müssen Plasmide vollständig linearisiert werden, damit die Polymerase nicht um den ganzen Vektor herumläuft und zu lange Transkripte produziert. Die anschließende Aufreinigung zur kompletten Entfernung von RNasen (aus der Plasmid-Isolierung) erfordert einen Einsatz von relativ viel DNA.

Mix für den DNA-Verdau

- 10 µg DNA (oder weniger)
- 10 µL 10 x-Puffer (passend zum verwendeten Restriktions-Enzym)
- evtl. BSA und/oder Triton, falls vom Enzym gefordert
- 2 µL Restriktions-Enzym
- mit ddH₂O auf 100 µL auffüllen

Bei der vom Enzym geforderten Temperatur wird für mindestens 2 h bis über Nacht inkubiert.

Für die Aufreinigung wird zunächst durch Zugabe von 100 µL Tris-HCl 10 mM pH 8 das Volumen erhöht und anschließend mit 200 µL PCI (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25:24:1) die DNA gereinigt. Der Mix wird 10 s gevortex und 5-10 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert.

Die abgenommene obere Phase wird mit 200 µL Chloroform ein weiteres Mal gereinigt, 10 s gevortex und bei maximaler Geschwindigkeit 5-10 min zentrifugiert.

Für die Präzipitation der DNA wird die obere Phase mit 20 µL NaAc 3 M pH 5,2 versetzt, vermischt und mit 500 µL kaltem Ethanol aufgefüllt. Für eine bessere Präzipitation können 2-4 µL Glykogen (20 µg/µL) zugegeben werden.

Die Fällung erfolgt bei -20 °C oder -80 °C für 1 h bis über Nacht und anschließend wird bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit für 30 min zentrifugiert. Zuletzt wird das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und mit 20 µL RNase freiem Wasser aufgenommen.

2.2.17 Herstellung von Sense-RNA für Mikroinjektion

Für die Herstellung von Sense-RNA für die Mikroinjektion wurde das Ambion SP6 Message Machine Kit (Ambion) verwendet. Falls nötig kann auch T7- oder T3-RNA-Polymerase mit dem Kit verwendet werden.

Mix für die Transkription

- 1 µg linearisierte, PCI-gereinigte DNA
- 10 µL 2 x NTP/CAP Mix
- 2 µL RNA-Polymerase
- auf 20 µL mit RNase freiem Wasser auffüllen

Nach 2 h bei 37 °C wird 1 µL DNaseI zugegeben und weitere 20 min inkubiert, um die DNA-Matrize zu entfernen.

Für die PCI-Aufreinigung werden 115 µL RNase freies Wasser und 15 µL Ammonium Acetate Stop Solution aus dem Kit zugegeben und gut vermischt. Nach der Zugabe von 150 µL PCI und 10 s vortexen wird 5-10 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Zur oberen Phase werden 150 µL Chloroform gegeben und ebenfalls gevortext und zentrifugiert. Der Chloroform-Schritt wird wiederholt, da kein Phenol übrig bleiben darf, da es bei Injektion toxisch wirkt.

Am Schluss wird mit 150 µL Isopropanol für mindestens 20 min bei -20 °C gefällt und 40 min bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert.

Das Pellet wird mit 80 % Ethanol (in RNase freiem Wasser) gewaschen, getrocknet und mit 20 µL RNase freiem Wasser aufgenommen.

Die Lösung wird bei -80 °C aufbewahrt und möglichst selten aufgetaut, da die RNA schnell degradiert.

2.2.18 Herstellung von Anti-Sense-RNA-Sonden für *In Situ*-Hybridisierung

Für die Herstellung von DIG- oder Fluorescein-markierten RNA-Sonden wurde das "DIG-RNA Labeling Kit (SP6/T7)" verwendet.

Mix für die Transkription

- 1 µg linearisierte, PCI-gereinigte DNA
- 2 µL DIG- oder Fluorescein-markierte NTPs (10 x)
- 4 µL 5 x Transcription Buffer
- 2 µL RNA-Polymerase (SP6, T7 oder T3, 40 Units)
- 2 µL RNase inhibitor (kann auch weggelassen werden)
- auf 20 µL mit RNase freiem Wasser aufgefüllt

Nach 2 h bei 37 °C wird 1 µL DNase I zugegeben und für eine weitere halbe Stunde inkubiert.

Für die Präzipitation werden 11 µL Ammoniumacetat 7,8 M (RNase frei) und 63 µL 100 % Ethanol zugegeben.

Nach der Fällung für 30-50 min bei Raumtemperatur wird 30-40 min bei 20 °C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert.

Das RNA-Pellet wird mit 80 % Ethanol (in RNase freiem Wasser) gewaschen, getrocknet, in 20 µL RNase freiem Wasser aufgelöst und mit 80 µL Hyb-Puffer verdünnt.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Protein-Blotting

2.3.1.1 Western Blot

Vorbereitung der Proben

Embryonen für Western Blot müssen von Chorion und Dottersack befreit werden, da sie das Ergebnis verfälschen würden und, besonders der Dotter, extrem viel Protein enthalten.

Das Chorion kann per Hand oder mit Pronase entfernt werden. Dafür wird auf 37 °C vorgewärmte Pronase-Lösung (2 mg/mL in E2-Medium) auf die Embryonen (in einer mit Agarose ausgegossenen Petrischale) gegeben, für ca. 10 min bei 37 °C inkubiert und das Chorion durch leichtes Schwenken der Schale aufgelöst. Danach wird 3 × mit E2-Medium gewaschen.

Für die Entfernung des Dottersackes verwendet man bei älteren Embryonen (ab ca. 20 Somiten) eine 100 µL-Pipette. Jüngere Embryonen sind zu fragil und werden dadurch zerstört. Bei ihnen entfernt man den Dotter durch Zugabe von 1 mL Deyolking Buffer (in Eppendorf-Tubes) und Auf- und Ab-Pipettieren mit einer 1 mL Pipette. Die aufgelösten Embryonen werden 30 s bei 1100 rpm gevortext und bei 3000 rpm für 30 s abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet 2 × mit Western-Sample-Washing-Buffer gewaschen.

Die vom Dotter befreiten Embryonen werden in 1 µL Western-Proben-Puffer/Embryo aufgenommen und 4 × 30 s (Power 100, dazwischen 10 s Pause auf Eis) mit Ultraschall behandelt.

Die Proben werden für 5 min bei 100 °C gekocht und können anschließend bei -20 °C aufbewahrt werden.

Gelelektrophorese

Das Acrylamid-Gel für die SDS-Gelelektrophorese wird in zwei Teilen gegossen: der Untere Teil ist das Gel zur Protein-Auftrennung (Trenngel) und kann – je nach Protein-Größe – zwischen 5 und 15 % Acrylamid enthalten; der obere Teil, das Sammelgel, dient durch die geringe Porengröße, den niedrigeren pH-Wert und die geringere Ionenkonzentration einer “Sortierung” der Proteine und folglich schärferen Banden, und enthält 4 % Acrylamid.

Die Zusammensetzung der Gele ist in Tab. 4 zusammengefasst.

Tab. 4: Zusammensetzung der Gele für SDS-Page

	Trenngel					Sammelgel
	5%	75%	10%	12%	15%	4%
30 % Acrylamid (incl. 0,8 % PDA)	0,85 mL	1,25 mL	1,65 mL	2 mL	2,5 mL	325 µL
1 M Tris			1,875 mL			312,5 µL
10 % SDS			50 µL			25 µL
H₂O	2,2 mL	1,8 mL	1,4 mL	1,05 mL	0,55 mL	1,85 mL
10 % APS			50 µL			12,5 µL
TEMED			2,5 µL			2,5 µL
Σ			5 mL			2,5 mL

Zuerst wird das Trenngel zwischen die sehr sauberen und in die Gießvorrichtung geklemmten Glasplatten gegossen und mit Isopropanol bedeckt. Nach 30-60 min wird das Isopropanol vollständig entfernt, das Sammelgel direkt auf das Trenngel gegossen und der Kamm hineingesteckt. Die Gele müssen blasenfrei und relativ schnell gegossen werden, da das Acrylamid schnell polymerisiert.

Nach 30-60 min ist das Gel auspolymerisiert, wird in die vertikale Gelelektrophorese-Kammer gesteckt (die niedrigere Glasplatte nach innen) und die Kammer wird mit Western-Laufpuffer gefüllt. Dann wird der Kamm herausgezogen und die Slots mit 5-10 µL Probe bzw. 5 µL Marker (PreStained Protein Ladder, Fermentas) befüllt.

Das Gel wird bei 80 V laufen gelassen, bis die Proben das Trenngel erreicht haben. Danach wird auf 120 V erhöht und so lange laufen gelassen, bis die gewünschte Protein-Auftrennung erreicht ist.

Blotting

Um die Proteine vom Gel auf die Nylon-Membran (BioRad) zu überführen, wird eine "Sandwich-Kassette" mit folgenden in Blotting-Puffer eingeweichten Komponenten zusammengestellt: Schwarze Seite der Kassette, Schwammtuch, Whatman-Paper (Roth), Trenngel, Nylon-Membran, Whatman-Paper, Schwammtuch, rote Seite der Kassette. Die Kassette wird verschlossen und in die Blotting-Box gesteckt, die schwarze Seite der Kassette zur schwarzen Seite der Box (die Proteine laufen in Richtung positiver Elektrode). Die Box wird mit einem Eis-Block und eiskaltem Blotting-Puffer befüllt und in eine Eiswanne gestellt. Geblottet wird für 1h bei 100 V.

Gesamtproteinfärbung

Die Effizienz des Blotvorgangs kann mit Hilfe von Ponceau S, das generell Proteine anfärbt und leicht wieder zu entfernen ist, überprüft werden. Dazu wird 1 Teil Ponceau-S-Stammlösung mit 9 Teilen ddH₂O gemischt und die Membran damit bedeckt. Nach 5-10min bei Raumtemperatur auf dem Shaker werden die Proteine sichtbar (rot). Die Membran (kurz mit PBS oder TBS gewaschen) kann nun fotokopiert/gescannt oder mit einem Bleistift markiert werden.

Nachweisreaktion

Die Membran wird 2 × in PBST gewaschen um Blotting-Puffer (oder Ponceau S) zu entfernen und 1 h bei Raumtemperatur auf dem Shaker mit Superblotto geblockt.

Der primäre Antikörper wird in 5 % Milchpulver (Skimmed Dry Milk, Töpfer GmbH) in TBST wie gefordert verdünnt und mindestens 1 h bis über Nacht bei 4 °C auf dem Shaker inkubiert.

Anschließend wird die Membran 3 × 10-15 min mit TBST gewaschen und für 1 h mit dem sekundären Antikörper (HRP-gekoppelt) in Superblotto bei Raumtemperatur auf dem Shaker inkubiert.

Visualisierung durch Chemilumineszenzreaktion

Nach dem Waschen mit PBST (4 × 10-15 min) kann die enzymatische Reaktion mit dem ECL Staining Kit (Pierce) erfolgen. Dazu werden die beiden Lösungen 1:1 gemischt und auf die in einer Kassette liegende Membran gegeben. Nach exakt 1 min wird die überschüssige Lösung entfernt und die Membran einem Röntgenfilm ausgesetzt. Zunächst wird für 1 min exponiert, der Film entwickelt und bei Bedarf die Expositionsdauer entsprechend erhöht.

Falls das Signal sehr schwach ist, kann mit dem SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce) gearbeitet werden. Dieses Substrat verstärkt die Sensitivität, Intensität und Dauer des Signals und ermöglicht die Detektion schwächster Signale.

2.4 Zellbiologie

2.4.1 Herstellung von Vibratom-Schnitten

Für Vibratom-Schnitte werden Embryonen über Nacht in 4 % PFA/30 % Saccharose in PBS fixiert, kurz in PBT gewaschen und in ca. 50 °C warmer Low Melting Agarose in eingebettet. Dazu werden die Embryonen in Cryo-Moulds (Sakura) gelegt, mit Agarose bedeckt und mit einer dünnen, an der Spitze umgebogenen Kanüle ausgerichtet, bevor die Agarose fest wird.

Die Blöckchen werden aus den Cryo-Moulds genommen, zurechtgeschnitten, auf Metall-Objektträger geklebt und können sofort im Vibratom geschnitten werden.

In die Wanne des Vibratoms wird PBT gefüllt, aus dem die geschnittenen Embryonen, die dazu tendieren, aus der Agarose zu fallen, mit einer Glaspipette herausgesammelt werden.

Für die Schnitte wurde eine Dicke von 100 bis 200 µm gewählt.

2.4.2 Herstellung von Gefrierschnitten

Fixierte Embryonen wurden kurz in PBT gewaschen, in 30 % Sucrose in PBS bis sie auf den Boden des Tubes gesunken sind, in Cryo-Moulds ausgerichtet, von überschüssiger Flüssigkeit befreit, mit Tissue-Tek® (Sakura) gut bedeckt und bei -80 °C eingefroren.

Für den Transport der Blöckchen zum Cryostat ist unbedingt darauf zu achten, dass sie nicht auftauen. Ebenso sind alle am Cryostat verwendeten Geräte (Probentische, Messer, Pinsel, Pinzetten, Skalpelle) und das Cryostat selbst auf -20 °C zu kühlen.

Es wurden Schnitte von 12-15 µm Dicke hergestellt, mit (warmen!) Objektträgern (Super Frost plus von) aufgenommen und 15 min bei 65 °C getrocknet.

Bei -20 °C sind die Schnitte mehrere Monate lagerbar.

2.4.3 Herstellung von Plastikschnitten

Zur Herstellung von Plastik-Schnitten werden fixierte Embryonen kurz in PBS gewaschen und schrittweise (30 %, 50 %, 75 %, 2 × 100 % Ethanol/PBS, jeweils 10 min) in Ethanol überführt.

Anschließend werden die Embryonen in JB-4 eingebettet. Dazu werden sie in Infiltration Solution (Solution A plus Katalysator) bei Raumtemperatur inkubiert, bis sie zu Boden sinken. Die Lösung wird einmal ausgetauscht. Zuletzt werden sie in Embedding Solution (Infiltration Solution plus JB-4) überführt und schnell ausgerichtet. Das Gefäß (Eppendorf-Tubes funktionieren gut) verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur aushärten gelassen.

Mit einem Mikrotom werden 2 µm dicke Schnitte hergestellt. Dazu wurden Glas-Messer verwendet, die von der Gruppe Elektronenmikroskopie im MDC zur Verfügung gestellt wurden.

2.4.4 Injektionen

Mit einem Needle Puller (die Einstellungen sind je nach Gerät und Heizfilament unterschiedlich und müssen individuell ausprobiert werden) werden aus Glas-Kapillaren Injektionsnadeln gezogen. Für die richtige Größe der Öffnung werden sie mit einem Skalpell unter einem Stereomikroskop gekappt.

Für die Fixierung der Eier während der Injektion werden mit Hilfe von Plastik-Schablonen Halterungen aus 1,5 % Agarose in Egg Water in Petrischalen gegossen. Die Schablonen hinterlassen einen Abdruck aus Rillen in der Agarose, in die die Eier mit Chorion gedrückt werden können (ein Bauplan für die Schablone findet sich hier: http://zfin.org/zf_info/zfbook/chapt5/5.1.html). Die Eier werden so fixiert und bleiben nicht an der Injektionsnadel hängen, wenn diese wieder heraus gezogen wird. In die Petrischale wurde Danieau's Medium gegeben und die Eier mit einer Pinzette in die Rillen gedrückt.

Die Injektionsnadel wurde mit der zu injizierenden Lösung befüllt, in den Mikromanipulator gespannt und mit Hilfe von Injektionsgerät und Druckluft portionsweise in die Eier injiziert.

2.4.5 Immunhistochemie

2.4.5.1 Antikörper-Färbungen auf ganzen Embryonen und auf Vibratom-Schnitten

Die Embryonen wurden über Nacht in 2 % PFA in PBS fixiert, 3 × kurz in PBDT gewaschen und mindestens 2 h in Antikörper-Block inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte bei 4 °C mindestens über Nacht bei langsamem Schütteln.

Gewaschen wurden die Embryonen 2 × kurz und 6 × über den ganzen Tag verteilt in Antikörper-Block bei Raumtemperatur und langsamem Schütteln.

Der sekundäre Antikörper wurde ebenso über Nacht inkubiert, wobei auf Lichtschutz geachtet werden muss.

Die Waschungen erfolgten 2 × kurz und 6 × über den Tag verteilt und über Nacht in Antikörper-Block.

Zum Einbetten wurden die Schnitte mit SlowFade® Gold Antifade Reagent (Invitrogen) benetzt, mit Vaseline umrandet und mit einem kleinen Deckglas bedeckt.

2.4.5.2 Antikörper-Färbungen auf Gefrierschnitten

Die (trockenen) Schnitte wurden auf dem Objektträger mit einem PAP-Pen (Polysciences) umrandet, um das Abfließen der Lösungen zu verhindern, kurz in PBS rehydriert und anschließend 90 min in Antikörper-Block inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer (ebenso die nächsten Schritte).

Gewaschen wurden die Embryonen 2 × kurz und 3 × 20 min in Antikörper-Block bei Raumtemperatur.

Der sekundäre Antikörper wurde 90 min im Dunkeln inkubiert.

Die Waschungen erfolgten 2 × kurz und 4 × 20 min in Antikörper-Block.

Zum Einbetten wurde Mowiol verwendet. Dazu wurde die restliche Flüssigkeit entfernt, ca. 40 µL Mowiol auf den Objektträger gegeben, mit einem Deckglas zugedeckt und einige Stunden getrocknet. Die Schnitte sind bei 4 °C mehrere Monate bis Jahre haltbar.

2.4.6 Apoptose-Detektion

Für den Nachweis pyknotischer Zellen wurden Acridine Orange, die TUNEL-Technologie und eine Antikörper-Färbung (siehe dort) mit α -active-Caspase 3 verwendet.

2.4.6.1 Acridine Orange

Acridine Orange (Molecular Probes) ist ein Farbstoff, der an DNA bindet, aber für den Membranen intakter Zellen nicht durchlässig sind, Membranen apoptotischer Zellen sind jedoch durchlässig, was zur spezifischen Färbung dieser Zellen führt.

Lebende Embryonen wurden für 15 min in 5 μ g/mL Acridine Orange in Danieau's Medium bei Raumtemperatur inkubiert, 5 \times 5 min in Danieau's gewaschen und sofort unter UV-Licht mit GFP-Filter betrachtet.

2.4.6.2 TUNEL-Färbung

Die TUNEL-Färbung (**T**erminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP **N**ick **E**nd **L**abeling) wurde mit dem "*In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein" oder "*In Situ* Cell Death Detection Kit, TMR red" (Roche) nach der mitgelieferten Anleitung für Gefrierschnitte durchgeführt.

2.4.7 BrdU-Färbung

Für BrdU-Färbungen wurde zunächst 10 mM BrdU in 0,2 M KCl in den Dotter injiziert. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurden die Embryos über Nacht in 4 % PFA fixiert. Von den Embryonen wurden Gefrierschnitte angefertigt und vor der Antikörperfärbung eine 30-minütige Behandlung mit 2N HCl durchgeführt.

2.4.8 Aktin-Färbung

Für Färbung von F-Aktin wurde Rhodamin-Phalloidin für 1 bis 2 Stunden oder länger, meist zusammen mit dem sekundären Antikörper für parallele Färbungen, auf Vibratom- oder Gefrierschnitten inkubiert.

2.4.9 Alcian Blue-Färbung

Fixierte Embryonen (in PTU aufgezogen, um die Pigmentierung zu unterdrücken) wurden in 0,1 % Alcian Blue, 80 % Ethanol, 20 % Eisessig über Nacht gefärbt, mehrmals in Ethanol gewaschen und schrittweise in PBS überführt.

2.4.10 HE-Färbung von Plastik-Schnitten

Die getrockneten Plastik-Schnitte auf Objektträgern wurden für 3-5 min in “Meyers Hämalanlösung für die Mikroskopie” (Merck) getaucht, 10-15 min in warmem, fließendem Wasser gewaschen, 1-3 min in 0,5 % Eosin-Lösung (Eosin für die Mikroskopie, Roth, konzentriertes Pulver) getaucht und nochmals wie oben gewaschen. Getrocknet wurden die Schnitte über Nacht bei Raumtemperatur oder auf einem Heiztisch und anschließend in Neo-Clear (Merck) getaucht, um sie zu klären. Nachdem die Reste Neo-Clear abgetropft waren, wurde ein Tropfen Neo-Mount (Merck) auf den Objektträger gegeben und mit einem Deckglas zugedeckt. Nach ein paar Stunden sind sie bereit für die Betrachtung und können bei Raumtemperatur gelagert werden.

2.4.11 *In Situ*-Hybridisierung

2.4.11.1 Fixierung und Aufbewahrung der Embryonen

Die Embryonen für die *In Situ*-Hybridisierung wurden über Nacht in 4 %igem PFA in PBS bei 4 °C fixiert, 3 × in 100 % Methanol gewaschen und in Methanol bei -20 °C aufbewahrt. Die Embryonen können mehrere Monate in Methanol aufbewahrt werden, sollten jedoch mindestens einige Tage darin verbleiben, da die Durchlässigkeit der Embryonen für die RNA-Proben verbessert wird.

Embryonen, die älter als 24 h waren, wurden in PTU aufgezogen, um die Pigmentierung zu unterdrücken, und vor der Fixierung von Hand dechorioniert, da sie sonst in gekrümmter Haltung fixiert worden wären.

2.4.11.2 Re-Hydrierung

Die Embryonen werden in 1,5 mL Eppendorf-Tubes überführt und schrittweise rehydriert, indem sie für jeweils 5 min in 75 % Methanol/25 % PBT, 50 % Methanol/50 % PBT, 25 % Methanol/75 % PBT und 4 × 5 min in 100 % PBT (oder, falls sie noch weiß erscheinen, öfter) inkubiert werden. Hier wie für die ganze Prozedur gilt es, die Lösungen langsam in die Tubes mit den Embryonen zu geben, da sie sehr fragil sind.

2.4.11.3 Verdau mit Proteinase K

Um Embryonen ab einem Alter von 24 hpf durchlässiger zu machen, werden sie kurz in einer Proteinase K-Lösung (10 µg/mL in PBT) verdaut. Die Länge des Verdaus hängt sehr von der Aktivität der Proteinase K ab und muss individuell bestimmt werden. Erfahrungsgemäß reicht bei frischer Proteinase K eine Zeit von 1 min für 24 hpf-Embryonen und 10 min für 3 dpf-Embryonen. Um den Verdau zu stoppen, werden die Embryonen 2 × kurz in PBT gewaschen.

2.4.11.4 Refixierung

Alle Embryonen (auch die nicht mit Proteinase K behandelten) werden für 20 min bei Raumtemperatur in 4 % PFA in PBS für 20 min fixiert und anschließend 5 × 5 min in PBT gewaschen.

2.4.11.5 Prä-Hybridisierung

Die Embryonen werden in 0,5 – 1 mL Hyb-Puffer (mit Torula-RNA) für 2-5 h oder über Nacht bei 67 °C in einem Heizblock prähybridisiert, um unspezifische Bindungsstellen für RNA zu blockieren.

2.4.11.6 Hybridisierung

Nach der Prä-Hybridisierung wird der auf 67 °C vorgeheizte Hybridisierungs-Mix auf die Embryonen gegeben. Die Konzentration für jede RNA-Sonde muss empirisch bestimmt werden. Für neue Sonden wurde mit einer Konzentration von 1 µL Sonde (siehe Protokoll “Herstellung von RNA-Sonden für die *In Situ*-Hybridisierung”) auf 200 µL Hyb-Puffer begonnen.

Soll eine zweite, rote, Färbung angeschlossen werden, müssen hier ebenfalls die mit Fluorescein markierten Sonden zugegeben werden.

Inkubiert wurde über Nacht bis übers Wochenende.

2.4.11.7 Entfernung nicht hybridisierter RNA-Sonde

Alle Lösungen für die Waschungen müssen auf 67 °C vorgeheizt werden, und die Embryonen dürfen nur kurz aus dem Heizofen genommen werden, damit die Temperatur nicht unter 67 °C fällt, da sonst die Hybridisierung der RNA-Sonde nicht mehr gewährleistet ist.

Waschungen:

- 1 x 20 min Hyb-Puffer
- 3 x 20 min 50 % SSCT (2 x)/50 % Formamide
- 1 x 20 min 75 % SSCT (2 x)/25 % Formamide
- 2 x 20 min 100 % SSCT (2 x)
- 4 x 30 min 0,2 x SSCT
- 5 min PBT

Wenn die Embryonen in PBT sind, können sie aus dem Heizofen genommen werden und auf Raumtemperatur abkühlen.

2.4.11.8 Blocken unspezifischer Bindungsstellen für Antikörper

Die Embryonen wurden für mindestens eine Stunde in frisch angesetzter Blocking-Solution (5 % Sheep-Serum, 10 mg/mL BSA in PBT, zum Auflösen etwas erwärmen) bei Raumtemperatur auf einem langsamen Shaker inkubiert. Die Embryonen müssen vor Licht geschützt werden, falls Fluorescein-Sonden benutzt wurden.

2.4.11.9 Antikörper-Inkubation

Die Embryonen wurden in 100-200 µL/Tube anti-DIG-AP-Antiserum 1:4000 in PBT + 2 mg/mL BSA inkubiert. Der Antikörper wurde präabsorbiert gegen Embryonen möglichst vieler Altersstufen (ca. 200 Embryonen, gewaschen und fixiert, werden mit dem Antikörper (1:400 in PBT/BSA) mindestens 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert, auf 1:4000 verdünnt und mit einem Zellulose-Acetat-Filter 0,2 bis 0,45 µm steril gefiltert), ist wiederverwendbar und wird bei 4 °C aufbewahrt (+ 0,02 % Natrium-Azid).

Die Inkubation erfolgt bei 4 °C über Nacht bis über zwei Tage ohne zu Schütteln.

2.4.11.10 Waschen nach der Antikörper-Inkubation

Die Antikörper-Lösung wird vorsichtig abgenommen, da sie wiederverwendet werden kann. Die Embryonen werden zwei mal kurz und 6-8 × verteilt über drei Stunden mit PBT gewaschen. Zwischen den Waschschritten werden sie bei Raumtemperatur langsam geschüttelt und, falls Fluorescein verwendet wurde, vor Licht geschützt.

2.4.11.11 Färbe-Reaktion

Die Embryonen werden 3 × 5 min in frisch zubereitetem NTMT-Puffer gewaschen, währenddessen in 24-Well-Plates überführt und anschließend in 0,5 mL/Well NBT/BCIP-Lösung in NTMT gefärbt. Für das Überführen der Embryonen in 24-Well-Plates zur besseren Beobachtbarkeit der Färbe-Reaktion muss unbedingt eine 1 mL-Pipette mit abgeschnittener Plastik-Spitze verwendet werden, da sie an Glas kleben bleiben.

Die Färbe-Reaktion kann je nach Sonde bei 4 °C, bei Raumtemperatur oder im Inkubator bei 28,5 °C (langsame bis schnelle Färbung) durchgeführt werden und sollte von Zeit zu Zeit unter einem Stereo-Mikroskop überwacht werden.

Die Färbe-Reaktion kann durch Austausch der Färbe-Lösung gegen NTMT-Puffer unterbrochen und durch Zugabe frischer NBT/BCIP-Lösung wieder gestartet werden. Ebenso kann die Färbereaktion durch Zugabe frischer Lösung beschleunigt werden.

Um die Reaktion zu stoppen werden die Embryonen 3 × mit PBT gewaschen und anschließend in STOP-Lösung aufbewahrt. Langfristige Aufbewahrung kann in 80 % Glycerol/20 % STOP-Lösung erfolgen.

2.4.11.12 Anschluss einer zweiten Färbung

Um eine Färbung Fluorescein-markierter Sonden anzuschließen, muss zunächst der erste Antikörper mit 0,1 M Glycin/HCl/0,1 % Tween 20 pH 2,2 (2 × 5 min in 1,5 mL-Tubes, gut schütteln, 4 × 5 min in PBT waschen) entfernt werden.

Die Antikörper-Färbung mit anti-Fluo-AP (präabsorbiert, 1:4000 in PBT +2mg/mL BSA), die anschließenden Waschungen und die Färbereaktion (mit BCIP/INT statt NBT/BCIP) werden wie in beschrieben durchgeführt.

2.4.11.13 Betrachtung von gefärbten Embryonen

Um Aufnahmen zu machen, können die Embryonen in 100 % Ethanol oder Benzyl-Benzoat geklärt werden, dies führt auch zu einem intensiveren Blau der Färbung. Die Rot-Färbung wird so allerdings entfernt.

2.5 Materialien

2.5.1 Lösungen und Puffer

Antikörper-Block

PBDT pH 7,4

0,3 % Triton X-100 (usb®)

10 % NGS (Normal Goat Serum, Invitrogen) (für Waschungen 1 %)

Danieau's Medium

58 mM NaCl

0,7 mM KCl

0,4 mM MgSO₄

0,6 mM Ca(NO₃)₂

5 mM HEPES, pH 7,6

Deyolking-Buffer

55 mM NaCl

1,8 mM KCl

1,25 mM NaHCO₃

DIG- oder Fluo-markierte NTPs (10 x)

10 mM ATP (Stammlösung 100 mM)

10 mM GTP (Stammlösung 100 mM)

10 mM CTP (Stammlösung 100 mM)

6,5 mM UTP (Stammlösung 100 mM)

3,5 mM DIG- oder Fluo-UTP (Stammlösung 10 mM)

RNase freies Wasser

E2-Medium

15 mM NaCl

0,5 mM KCl

2,7 mM CaCl₂

1 mM MgSO₄

0,7 mM NaHCO₃

0,15 mM KH₂PO₄

0,05 mM Na₂HPO₄

Egg Water, 60 x Stammlösung

172 g NaCl

7.6 g KCl

29 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

49 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

auf 10 L H_2O

Bei -20 °C aufbewahren

für 1 L Medium: 16 mL Stammlösung auf 1 L dH_2O + 3 mL 0,01 % Methylen Blau (Fungizid)

Embryo Water

Fisch-Wasser + 3 g Instant Ocean Red Sea Salt

Fisch-Wasser

18 g Instant Ocean Red Sea Salt

75 g Sodium bicarbonate

8.4 g Calcium sulphate

1000 L Osmose-Wasser

pH 6,8 - 7,5, Wassertemperatur 26 - 27 °C, Lufttemperatur 27 - 29 °C

Hybridisierungs-Puffer für *In Situ*-Hybridisierung (Hyb-Puffer)

SSC 5 x (vom 20 x Stock, am Schluss mit ddH_2O auffüllen)

50 µg/mL Heparin

0,1 % Tween 20

500 µg/mL Torula-RNA (kann für zum Waschen verwendeten Hyb-Puffer weggelassen werden)

9 mM Zitronensäure

pH 6,0 – 6,5

mit ddH_2O bis zur Hälfte der benötigten Menge auffüllen

50 % Formamid

Lösungen für Plasmid-Präparationen (Minipreps)

Lösung 1:

50 mM Glukose

10 mM EDTA pH 8,0

25 mM Tris/HCl pH 8,0

gefiltert mit 0,2 µm-Filter

60 µg/mL RNase A

Lösung 2:

0,2 M NaOH

1 % (w/v) SDS (Sodiumdodecylsulfat)

Lösung 3:

3 M Kaliumacetat

11 % (v/v) Eisessig

pH 4,8

Mowiol

Mowiol 4-88 (Calbiochem) wurde nach Anleitung rekonstituiert und aliquotiert bei -20 °C aufbewahrt

NTMT-Puffer

100 mM Tris HCl pH 9,5

50 mM MgCl₂

100 mM NaCl

0,1 % Tween 20

PBS, 10 x Stammlösung, für 1 L

80 g NaCl

2 g KCl

18 g Na₂HPO₄ (2 H₂O)

2,4 g KH₂PO₄

pH ca. 7,2, nicht autoklavieren

PBDT

PBS pH 7,4

1 % DMSO

0,1 % Tween 20

PBT

PBS, pH 7,4

0,1 % Tween 20

Proteinase K Stammlösung für *In Situ*-Hybridisierung (10 mg/mL)

10 mg/mL Proteinase K in PBS

Proteinase K Stammlösung (17 mg/mL)

100 mg Proteinase K in 6 mL ddH₂O (steril) auflösen

Proteinase K Lösung zum Verdauen von Gewebe für DNA-Isolierung

1,7 mg/mL Proteinase K (Stammlösung 17 mg/mL) in TE

PTU-Lösung zum Aufziehen transparenter Embryos

0.003 % 1-phenyl-2-thiourea in Egg-Water

Ringer-Lösung

116 mM NaCl

2.9 mM KCl

1.8 mM CaCl₂

5 mM HEPES pH 7.2

SSC 20 x Stammlösung

3 M NaCl

0,3 M Na₃Citrat

pH 7,0

SSCT 2 x

SSC 2 x

0,1 % Tween 20

SSCT 0,2 x

SSC 0,2 x

0,1 % Tween 20

STOP-Lösung für *In Situ*-Hybridisierung

0,05 M Phosphat-Puffer pH 5,8 (100 mL 0,1 M: 92 mL 0,1 M NaH₂PO₄, 8 mL 0,1 M Na₂HPO₄)

1 mM EDTA

0,1 % Tween 20

Superblotto

10 mM Tris HCl pH 8,0
150 mM NaCl
0,1 % Tween 20
0,5 % NP-40
0,5 % BSA
2,5 % Milchpulver (Skimmed Dry Milk, Töpfer GmbH)

TBST

20 mM Tris
137 mM NaCl
pH auf 7,6 einstellen
0,05 % Tween 20

Tricain-Lösung zur Anästhesie von Embryonen und adulten Fischen

20 µL Tricain-Stammlösung
500 µL Danieau's (oder andere Lösungen für Embryonen oder Fische)

Tricain-Stammlösung

400 mg Tricain (Pulver)
97,9 mL ddH₂O
2,1 mL Tris 1 mM pH 9,0
pH 7,0
aliquotieren und bei -20 °C aufbewahren

TE-Puffer

10 mM Tris pH 8,0
1 mM EDTA pH 8,0

Western-Laufpuffer

100 mL Western-Puffer Stammlösung
10 mL 10 % SDS
mit ddH₂O auf 1 L auffüllen, etwas aufwärmen und rühren, bis sich alles gelöst hat

Western-Proben-Puffer

12,5 mL 2 M Tris pH 6,8

4 g SDS

0,1 g Bromphenolblau

20 mL Glycerol

2 mL β -Mercaptoethanol

mit ddH₂O auf 50 mL auffüllen, aliquotieren und bei -20 °C aufbewahren

Western-Puffer Stammlösung (10 x)

30 g Tris

144 g Glyzin

mit ddH₂O auf 1 L auffüllen

Western-Sample-Washing-Buffer

110 mM NaCl

3,5 mM KCl

2,7 mM CaCl₂

10 mM Tris HCl pH 8,5

2.5.2 Antikörper

2.5.2.1 Primäre Antikörper

anti active Caspase 3 (BD Pharmingen, 1:200, Rabbit)

anti CAP-G (Bethyl, 1:200, 1:2500 f. Western Blot, Rabbit)

anti-BrdU (Roche, 1:1000)

anti-DIG-AP (Roche, 1:4000, f. *in situ*-Hybridisierung)

anti-Fluo-AP (Roche, 1:4000, f. *in situ*-Hybridisierung)

anti HA (Invitrogen, 1:200, 1:1000 f. Western, Rat)

PH3 (anti-phosphorylated Histone H3; Upstate Biotechnology, 1:1000, Rabbit)

zn-5 (University of Oregon Zebrafish International Ressource Center, ZIRC, 1:1000, Mouse)

zpr-1 (ZIRC, 1:200, Mouse)

zrf-1 (ZIRC, 1:200, Mouse)

2.5.2.2 Sekundäre Antikörper

Goat anti Rabbit RRX (Jackson Immuno Research, 1:200)

Goat anti Rabbit FITC (Jackson Immuno Research, 1:100)

Goat anti Mouse FITC (Jackson Immuno Research, 1:100)

Goat anti Mouse RRX (Jackson Immuno Research, 1:100)

Goat anti Mouse Cy5 (Jackson Immuno Research, 1:100)

Goat anti Rat FITC (Jackson Immuno Research, 1:200)

Goat anti Rat Rhodamine (Jackson Immuno Research, 1:200)

Goat anti Rat HRP (Chemicon, 1:10000 f. Western Blot)

Goat anti Mouse HRP (Jackson Immuno Research, 1:10000 f. Western Blot)

2.5.3 Primer

Die Mapping-Primer können Tab. im Anhang entnommen werden.

Alle anderen Primer sind in Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 5: Verwendete Primer

Name	Sequenz	Verwendung
S1cond_fw	CAACAAGCCCTGATGACCTT	zCAP-G
S2cond_rv	AGGGAAAATAGGCTCCCTCA	zCAP-G
S3cond_fw	CAGACTCCAGGACCCCACTA	zCAP-G
S4cond_fw	CCTCGAGCGGCCCGCCGGGCAGG	zCAP-G
S5cond_rv	TTTCTCCTTGACGTCCCTTG	zCAP-G
S6cond_rv	CAGCAGGATTAGGGTTGGAA	zCAP-G
S7cond_fw	CGAGATGATGCCAGAAAAT	zCAP-G
S8cond_rv	CAGACAATGGCGCAGTCTT	zCAP-G
S9cond_rv	TTGGCCTCCTGGTTTATGAG	zCAP-G
S10cond_fw	TCCATCAGTGCGACCAAG	zCAP-G
S11cond5utr_fw	CTTAACGTTAGAGAGTCATTGG	zCAP-G
S12cond_fw	AACATCATGCCTGGAGACGCGGATC	zCAP-G
S13cond_rv	TACTGCTACTTTAGCTTCTGTTGG	zCAP-G
S14cond_fw	GTGGCGCTTTCGTCGTTTTCAAC	zCAP-G
S15cond_rv	TTATGAAATAGATCTCAGCTATGC	zCAP-G
S16cond_rv	GGTACATTTTGCCTGTACACC	zCAP-G
S17cond_fw	ATGCAGTAATAACATCATGCCTGGAGAC	zCAP-G
S18_CAP-G5utrClal_fw	AAAAAATCGATGTGGCGCTTTCGTCGTTTTCAAC	zCAP-G
S19_CVClal_rv	AAAAAATCGATATTCTTTGCAGTGGCAGCTT	zCAP-G
S20_CAP-Gstop_rv	TTATGAACCATTTGCCTCCTGGT	zCAP-G
S21_CAP-G3utr_rv	AGCATACAAAGTTCAAATGAAACAGGAG	zCAP-G
S22zCAP-G5_fw	TTTCCAAGCCTTTTATGCAGT	zCAP-G
S23zCAP-G600_rv	TAGTGGGGTCCTGGAGTCTG	zCAP-G
S24zCAP-G400_fw	TGCGATTTTCGAGTTTGTGAG	zCAP-G (enth. Fehler)
S25zCAP-Gatg_fw	ATGCCTGGAGACGCGGAT	zCAP-G
S26Clalmyccap-g_fw	CCATCGATAGCACCATGGTCGACGAACAAAACTCATC TCAGAAGAGGATCTGATGCCTGGAGACGCGGAT	zCAP-G
S27cap-gXbal_rv	CGTCTAGATTATGAACCATTTGGCCTCCTGGT	zCAP-G
S28deltaPH_rv	GCTCTAGATTACATCAGCTTGGCCAG	zCAP-G
S29deltaH2PH_rv	GCTCTAGACTAGGCACACATTGTCAGAC	zCAP-G
S30cbl_rv	GCTCTAGATTATTTCTGCGTTTCTCATTCTC	zCAP-G
S31Cap-G_rv	TCTCATTACAAACACGCAACG	zCAP-G
S32zCAP-G2_fw	TTCATGACTTCCTGCTGGTG	zCAP-G2 (in situ-Sonde)

Name	Sequenz	Verwendung
S33zCAP-G2_rv	CATCAGCTTGCCCGTTTAAAT	zCAP-G2 (<i>in situ</i> -Sonde)
S34zCAP-Gmyc_fw	CCATCGATAGCACCATGGTCGACG	zCAP-G
S38CapGNhel_rv	CTAGCTAGCTTATGAACCATTGGCCTCCTGGT	zCAP-G
S39dPHNhel_rv	CTAGCTAGCTTACATCAGCTTGGCCAG	zCAP-G
S40dH2PHNhel_rv	CTAGCTAGCCTAGGCACACATTGTCAGAC	zCAP-G
S41eGFPXho_rv	GGCCCTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTC	zCAP-G
S42capgEX_fw	AGAAGGAGATAAACAATGCCTGGAGACGCGGATCTG	zCAP-G
S43capgEXhis_rv	TGGTGATGGTGGTGACCCCATGAACCATTGGCCTCCTG GTT	zCAP-G
S44CapG_Cla1_fw	GCCATCGATCGCACCATGCCTGGAGACGCGGATCTG	zCAP-G
S45CapG_HAXba1_rv	GGCTCTAGATCAAGCGTAATCTGGTACGTCTGGGTATC CGCCACCTGAACCATTGGCCTCCTGG	zCAP-G HA-tag
S46CapG_DelPH_3'fw	CTCGTGCAACCTGCGGTCTGTAC	zCAP-G ΔPH
S47CapG_DelPH_5'rv	GGGATTGTACCACAGTAACACC	zCAP-G ΔPH
S48CapG_DelUVR_3'fw	CTCAAGAACCAGCTTACCCTGG	zCAP-G ΔUVR
S49CapG_DelUVR_5'rv	CACCTCAGCCAGTCTGACTTG	zCAP-G ΔUVR
S50cblgnc_rv	ACGGCTAAAGTCTTGACAGC	zCAP-G (genomisch)
BF937476_fw	TCTGGCATTTCTGTACAGTC	EST (<i>in situ</i> -Sonde)
BF937476_rv	TTGGTCTTAATGGAAAGTGCAT	EST (<i>in situ</i> -Sonde)
CV119151_fw	GCCATTGTCTGGGAGTTTTC	EST zCAP-G (<i>in situ</i> -Sonde)
CV119151_rv	ATTCTTTGCAGTGGCAGCTT	EST zCAP-G (<i>in situ</i> -Sonde)
DT882695_fw	AAATGCTTTCGGCTGTCGTA	EST (<i>in situ</i> -Sonde)
DT882695_rv	CCTCCTCCACTCTTTGCATC	EST (<i>in situ</i> -Sonde)
CO934043_fw	CATGGCTACTGGATGCATTG	EST (<i>in situ</i> -Sonde)
CO934043_rv	CCTCTCCCACTCTGTTCCAG	EST (<i>in situ</i> -Sonde)
CD595132_fw	AAGAATTCGCACGACGAAAC	EST (<i>in situ</i> -Sonde)
CD595132_rv	TCAACCAAGCCCTGTTTAGG	EST (<i>in situ</i> -Sonde)
KIAA1276_fw	GAGATGAAGAGAGAAAGCGAGA	EST (<i>in situ</i> -Sonde)
KIAA1276_rv	GCAATAATCGTTCTTTGGCTAC	EST (<i>in situ</i> -Sonde)
elavl3_fw	CAAGGCTATCAACACGCTCA	elavl3 (<i>in situ</i> -Sonde)
elavl3_rv	GGGGACAGGTTGTAGACGAA	elavl3 (<i>in situ</i> -Sonde)
pcna_fw	AGCCACTCCTCTGTCCAAGA	pcna (<i>in situ</i> -Sonde)
pcna_rv	AAGGGTTGACTGGATGAACG	pcna (<i>in situ</i> -Sonde)

2.5.4 *In Situ*-Sonden

Die verwendeten *in situ*-Sonden sowie die Enzyme, mit denen die Vektoren linearisiert werden und die zu Transkription verwendeten RNA-Polymerasen sind in Tab. 6 aufgeführt. Die Primer mit denen die Proben synthetisiert wurden, sind (falls vorhanden) Tab. 5 zu entnehmen.

Tab. 6: Verwendete *In Situ*-Proben. Alle Proben sind mit DIG gekoppelt, von zCAP-G wurde zusätzlich eine Fluorescein-gekoppelte Probe hergestellt.

Gen	Linearisieren mit	RNA-Polymerase	Konzentration	Länge
ath			1 µL/200 µL HybBuffer	
elavl3	Sall	T7	1 µL/200 µL HybBuffer	541 bp
pcna	Sall	T7	1 µL/200 µL HybBuffer	535 bp
zCAP-G (CV119151)	SacII	SP6	1 µL/200 µL HybBuffer	581 bp
BF937476	SacI	T7	1 µL/200 µL HybBuffer	400 bp
DT882695	SacI	T7		500 bp
CO934043	SacI	T7		300 bp

2.5.5 Morpholinos

Die Sequenzen der verwendeten Morpholino-Oligonukleotide und die zur Injektion verwendete Konzentration sind Tab. 7 zu entnehmen.

Tab. 7: Verwendete Morpholino-Oligonukleotide.

Gen	Sequenz	Konzentration
CAP-G	CAGATCCGCGTCTCCAGGCATGATG	200 µM
CAP-D2	CGGAACCATAAAATCCCACGACATC	100 µM
CAP-H	ACTAAATGCGCTCATAACGAAACTG	500 µM

2.5.6 Plasmide

Verwendet wurden die Plasmide pGEM®-T Easy (Abb. 8) und pCS2+ (Abb. 9).

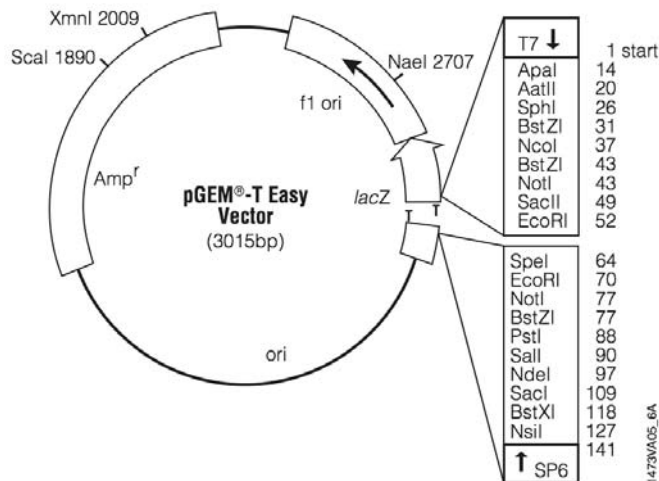


Abb. 8 Karte des Vektors pGEM®-T Easy

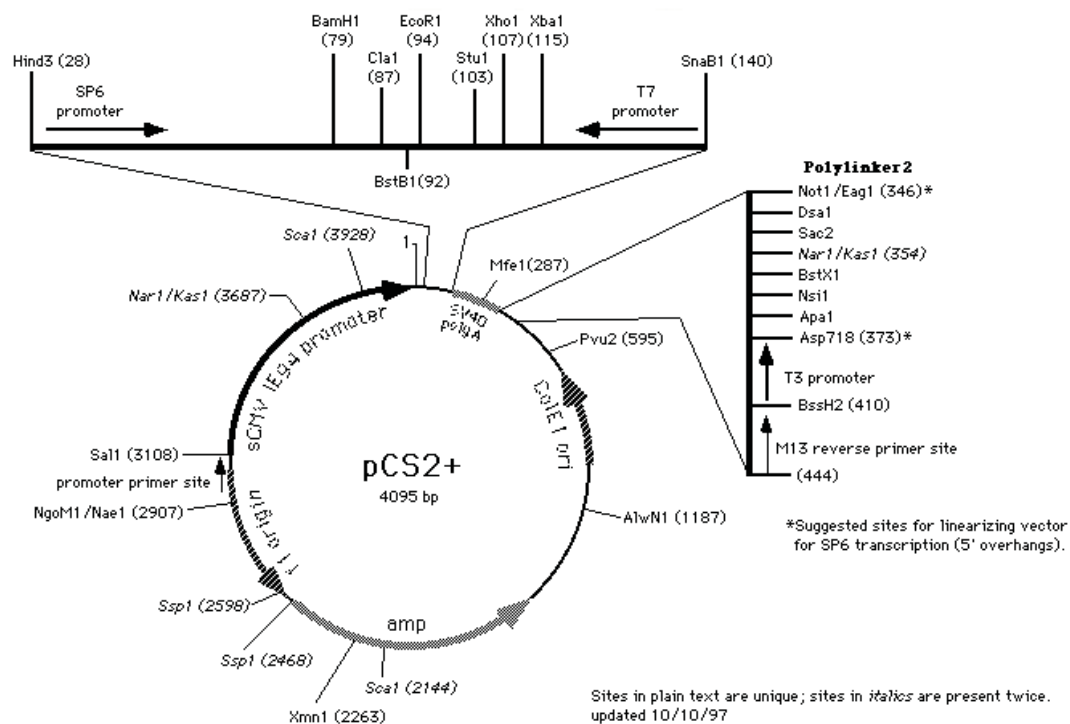


Abb. 9 Karte des Vektors pCS2+

2.5.7 Chemikalien

Die Chemikalien wurden wenn nicht anders angegeben bei Sigma-Aldrich, Merck, Roth oder Roche bezogen.

Enzyme: New England Biolabs, AppliChem, Promega oder Merck

Restriktionsenzyme: New England Biolabs, Fermentas oder Amersham Biosciences

Oligonukleotide: MWG (München) oder BioTez (Berlin)

Morpholino-Oligonukleotide: GeneTools

2.5.8 Geräte

Allgemeine Laborausstattung, wenn nicht anders angegeben, wurde von Bio-Rad (Elektrophorese), Life Technologies (Elektrophorese), Biozym Diagnostic GmbH (Thermocycler), Eppendorf (Zentrifugen, Heizblöcke, Thermomixer, Mikropipetten) bezogen.

Mikroskope: Axioplan 2 (Zeiss) mit Axiocam (Zeiss) oder Spot-Insight (Visitron) Digitalkamera und Metamorph-Software

Konfokale Mikroskope: Leica TCS SP2, Zeiss LSM 510 Meta

Stereomikroskope: verschiedene Modelle von Zeiss und Leica

Injektionsgeräte: MPPI-2 Pressure Injector/BP Back Pressure Unit (Applied Scientific Instrumentation)

Mikromanipulator: MM3 Micromanipulator (Maerzhaeuser)

Needle-Puller: Flaming/Brown Micropipette Puller (Sutter Instrument Corp.)

Cryostat: verschiedene Modelle von Leica

Vibrator: Leica VT1000 S

Mikrotom für Plastikschnitte: Leica SM2400

Spektrophotometer: GenQuant Pro (Amersham Pharmacia Biotech)

Sonicator: Bandelin Sonoplus

Bakterienschüttler: Certomat R (Braun)

Orbital Shaker: Heidolph Instruments

Vortex: Scientific Industries

2.5.9 Verbrauchsmaterial

Glas-Kapillaren zum Ziehen von Injektionsnadeln: Drummond Scientific Company

Objekträger: SuperFrost Plus® Menzel-Gläser

Parafilm: Pechiney Plastic Packaging

Röntgenfilme: Amersham Pharmacia Biotech

Alles weitere wurde von Roth, Eppendorf oder Biozym bezogen.

2.5.10 Bildbearbeitung und Bioinformatik

Bilder wurden mit Adobe Photoshop, Volocity (Improvision, Demo-Version) oder Aperture bearbeitet. Für die Vermessung von Zellen wurde ImageJ verwendet. Die Zusammenstellung der Bildtafeln und die Herstellung der Grafiken wurde mit Adobe Illustrator vorgenommen. Abb. 15D wurde mit Helicon Focus erstellt.

Für die Bearbeitung von Sequenzen wurden Sequencher, 4Peaks und MacVector verwendet.

Tabellenkalkulation und Statistik wurde mit Numbers (iWork 08) vorgenommen und die Grafik-Charts wurden in Keynote (iWork 08) bearbeitet.

Restriktionsschnittstellen wurden auf <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php> (New England Biolabs) analysiert.

Primer wurden mit Hilfe von Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) gemacht.

Für Online-Bioinformatik, Zebrafisch-Genom-Analyse und Blast-Search wurden, wenn nicht anders angegeben, folgende Web-Seiten verwendet:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

<http://smart.embl-heidelberg.de/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>

<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/Options/readseq.html>

<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>

<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=index&group=programs&subgroup=gfind>

http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/

http://www.ensembl.org/Danio_rerio/index.html

<http://wwwmap.tuebingen.mpg.de/>

<http://zebrafish.mgh.harvard.edu/zebrafish/index.htm>

http://zfin.org/cgi-bin/webdriver?MIval=aa-ZDB_home.apg

3 Ergebnisse

3.1 Die Mutante *creature from the black lagoon*

3.1.1 Äußeres Erscheinungsbild

Der *cbl*-(*creature from the black lagoon*-)Phänotyp ist gekennzeichnet durch kleine Augen und einen kleinen Kopf (Abb. 10B).

Die mutanten Embryonen entwickeln sich äußerlich zunächst ganz normal, erst bei ca. 3 dpf wird ein Unterschied zu den wildtypischen Geschwistern erkennbar (Abb. 10A und B). Zu diesem Zeitpunkt sind die Augen der Mutanten kleiner, wobei die Linse von normaler Größe ist und somit etwas stärker hervorsteht als bei normalen Augen (Abb. 10C und D). Der Phänotyp ist von variabler Expressivität und ist daher erst mit Sicherheit bei 4 dpf deutlich ausgeprägt. In Abb. 10D ist ein eher starker Phänotyp abgebildet. Die Mutation ist zygotisch rezessiv und der Phänotyp ist voll penetrant, es treten 25 % mutante Embryonen pro Gelege auf (siehe auch Kap. 3.1.3). Die Größe der Augen nimmt im Verlauf der nächsten zwei bis drei Tage weiter ab und scheint bei 6 bis 7 dpf zu stagnieren. Die Mutanten Embryonen sterben bei ca. 7 bis 10 dpf.

Die allgemeine morphologische Entwicklung erscheint normal und verläuft in der normalen Geschwindigkeit. Furchung, Blastula, Epibolie, Gastrulation, Somitogenese, Schwanz, Streckung der Körperachse, Herz, Blutzirkulation, Pigmentation, Flossen, Muskel- und Augenbewegungen, Nervensystem inklusive Gehirn (auch Ventrikel, Rhombomere, Midbrain-Hindbrain-Boundary etc.), Notochord, Ohren- und Nasenprimordien sind vom Wildtyp nicht zu unterscheiden. Leichte Abweichungen ergeben sich ab Tag 3 in der Größe des Gehirns und der Schwimmblase, die oft etwas kleiner erscheint. In Embryonen mit sehr starkem Phänotyp können ab Tag 5 perikardiale Ödeme auftreten.

Der Phänotyp variiert zwischen den Gelegen von verschiedenen Elternpaaren. Hier könnte der genetische Hintergrund eine Rolle spielen. Die im genetischen Hintergrund

“Tübingen Longfin” erzeugte Mutation zeigt in ihrem ursprünglichen Hintergrund einen etwas schwächeren Phänotyp als die Mutanten, die schon mehrmals mit WIK ausgekreuzt wurden. Für diese Arbeit wurden Embryonen von Eltern mit einem mittelschwer ausgeprägten Phänotyp ausgewählt, falls nicht anders angegeben.

Das äußere Erscheinungsbild der Zebrafisch-Mutante *creature from the black lagoon* (*cbl*) zeichnet sich aus durch kleine Augen, die ab 3 dpf auftreten und neben einem geringfügig kleineren Kopf das einzige sichere phänotypische Merkmal sind.

3.1.2 Histologische Schnitte von *cbl*-Mutanten zeigen Veränderungen und eine Reduktion der Anzahl der Zellen in der neuronalen Retina

Eine erste Analyse der Augenstrukturen wurde mit histologischen Methoden an Tag 5 vorgenommen. Deutlich ist zu sehen, dass die Retina stark verkleinert und in ihrer Morphologie verändert ist, die Linse hingegen ist normal (Abb. 10E und F). Das retinale Pigment-Epithel (RPE) erscheint verdickt und zeigt große, zellfreie Löcher. Auf Grund der geschrumpften neuronalen Retina reichen Teile des RPE bis in diese hinein. Die neuronale Retina lässt nur rudimentär die typische Schichtung erkennen und die verschiedenen Zelltypen lassen sich kaum identifizieren (Reste von Photorezeptor-Zellschicht, innerer Zellkernschicht, innere plexiforme Schichten und Ganglienzellen). Viele Zellkerne sind stark verändert und erscheinen vergrößert oder verdichtet (Abb. 10F).

Durch eine Rhodamin-Phalloidin-Färbung der Retina gegen F-Aktin an Retina-Schnitten im Alter von 3 dpf sind die Teile der Retina mit einer hohen Dichte an Membranen besonders stark gefärbt, da F-Aktin hauptsächlich an der inneren Oberfläche der Plasmamembran lokalisiert ist, und dort besonders in Bereichen der Zellkontakte. In *cbl*-mutanten Retina-Schnitten sind die innere und äußere plexiforme Schicht (Abb. 10H, Pfeilspitzen) deutlich ausgebildet. Diese Schichten bestehen hauptsächlich aus den Fortsätzen der Neuronen. Im Bereich der Zellkontakte zwischen den Photorezeptoren ist ebenfalls die typische punktförmige Färbung zu sehen (Abb. 10H, Pfeil). Die durch Aktin-Färbung sichtbar gemachte Morphologie der Zellen in der *cbl*-Retina ist geschädigt. Die CMZ der *cbl*-Retina (Abb. 10H, Asterisk) erscheint unregelmäßig, und zeigt zudem stärkere Aktin-Färbung als im Wildtyp. Im Bereich zwischen IPL und OPL scheint die radiale Ausrichtung der Zellen vorhanden zu sein, in einigen Bereichen aber unorganisierter als im Wildtyp (Abb. 10H, Pluszeichen).

Eine histologische Analyse der *cbl*-Retina zeigt, dass die Schichtung der Retina nur in Ansätzen ausgebildet wird und die Zellen aller Schichten Veränderungen aufweisen.

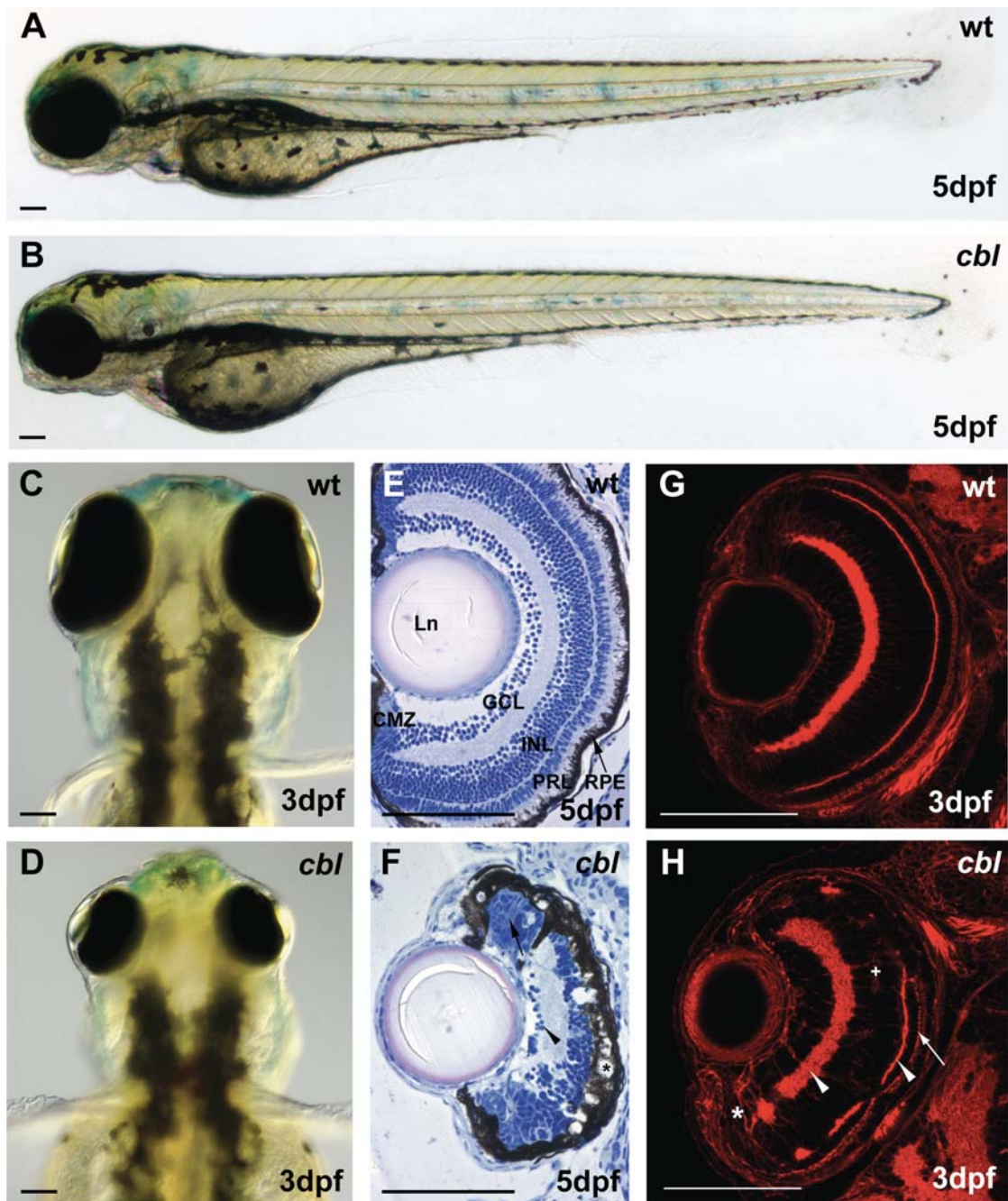


Abb. 10: Die Mutante *creature from the black lagoon* zeigt eine Reduktion der Augengröße. **A-D:** Lebende wt-Embryonen (A, C) und *cbf*-Embryonen (B, D) im Alter von fünf Tagen von der Seite (A, B) und im Alter von drei Tagen von dorsal (C, D). Die *cbf*-Mutante ist gekennzeichnet durch kleinere Augen und einen kleineren Kopf. **E, F:** Transversale histologische Schnitte durch Augen, gefärbt mit Hämalaun und Eosin. Das wildtypische Auge (E) zeigt die charakteristische Schichtung mit Ganglion-Cell-Layer (GCL), Inner Nuclear Layer (INL), Photorezeptorschicht (PRL), den beiden zwischen diesen Schichten liegenden plexiformen Schichten und dem retinalen Pigment Epithel (RPE). Rund um die Linse befindet sich die Ciliary Marginal Zone (CMZ). Im mutanten Auge sind alle Schichten der neuronalen Retina stark reduziert und nur wenige klar erkennbare Zellen vorhanden, wie z. B. Ganglienzellen

(Pfeilspitze). Die Ciliary Marginal Zone ist vergrößert und weist stark veränderte Zellen auf (Pfeil). Das retinale Pigment Epithel erscheint verdickt und weist Löcher auf (Asterisk). **G, H:** Transversale Schnitte durch Augen im Alter von 3 dpf, gefärbt mit Rhodamin-Phalloidin (F-Aktin-Färbung). Das mutante Auge (H) ist deutlich kleiner, zeigt aber die charakteristischen plexiformen Schichten (innere plexiforme Schicht, äußere plexiforme Schicht, Pfeilspitzen), und die CMZ (Ciliary Marginal Zone, Asterisk), sowie Zellkontakte zwischen den Photorezeptoren (Pfeil) und in der inneren Kernschicht (Pluszeichen). **A, B:** Seitenansicht, dorsal oben, anterior links. **C, D:** Dorsale Ansicht, anterior oben. **E-H:** Transversalschnitte, dorsal oben. Größenbalken 100 µm.

3.2 Positionales Klonieren

Die Mutante *creature from the black lagoon* wurde durch ENU-Behandlung von Fischen des Stammes Tübingen Long Fin erzeugt (genetischer Background) und mit Fischen des Stammes WIK ausgekreuzt. Bei Erhalt der Mutante aus dem Labor von Herwig Baier stand bereits fest, dass die Mutation auf Chromosom eins liegt.

3.2.1 Feinkartierung anhand von SSLP Markern der Tübingen Map

Anhand von Markern auf der Tübingen Map wurde mit der Feinkartierung (fine mapping) fortgefahren. Hierfür wurden zunächst die vorhandenen SSLP-Marker verwendet und per PCR-Analyse ausgewertet. Die am nächsten gelegenen Marker waren zunächst z7353 und z9395 (13 Rekombinante/58 Meiosen bzw. 7/56) auf der einen Seite und z6974 (4/80) auf der anderen (Abb. 11A). Die dazwischen gelegenen Marker waren nicht polymorph für die gegebenen Kreuzungen oder ergaben kein oder kein eindeutiges PCR-Produkt. Auf Grund der geringen Anzahl von vorhandenen Markern wurden parallel weitere Strategien verfolgt.

3.2.2 SSCP's von EST-Sequenzen

Um die auf der Tübingen-Map vorhandenen EST-Sequenzen als Marker zu verwenden, wurden sie auf Single-Strand-Conformation-Polymorphisms untersucht. Da jedoch die meisten Primer auf der genomischen DNA nicht anwendbar waren, wurde diese (zudem sehr aufwändige und teure) Technik nicht weiter verwendet.

3.2.3 Die zweite Montage des Zebrafisch-Genoms (Zv2)

Im Oktober 2003 wurde die zweite "Montage" (assembly) des Zebrafisch-Genoms vom Sanger-Center veröffentlicht (http://www.ensembl.org/Danio_rerio/index.html). Es wurde versucht, die Daten mit den Markern der genomischen Daten in Übereinstimmung zu bringen, was auf Grund der schlechten Datenlage nicht möglich war. Die Montage des Genoms wird nur durch das Computerprogramm Ensembl angefertigt und nicht noch einmal "per Hand" überprüft. Es zeigte sich, dass eine sehr hohe Rate an falscher Zusammenfügung der sehr kurzen Sequenzabschnitte (reads), durchschnittlich nur 651 bp, bestand und somit die Contigs (durchschnittlich 3030 bp lang) kaum brauchbar waren, größere genomische DNA-Abschnitte zusammenzufügen.

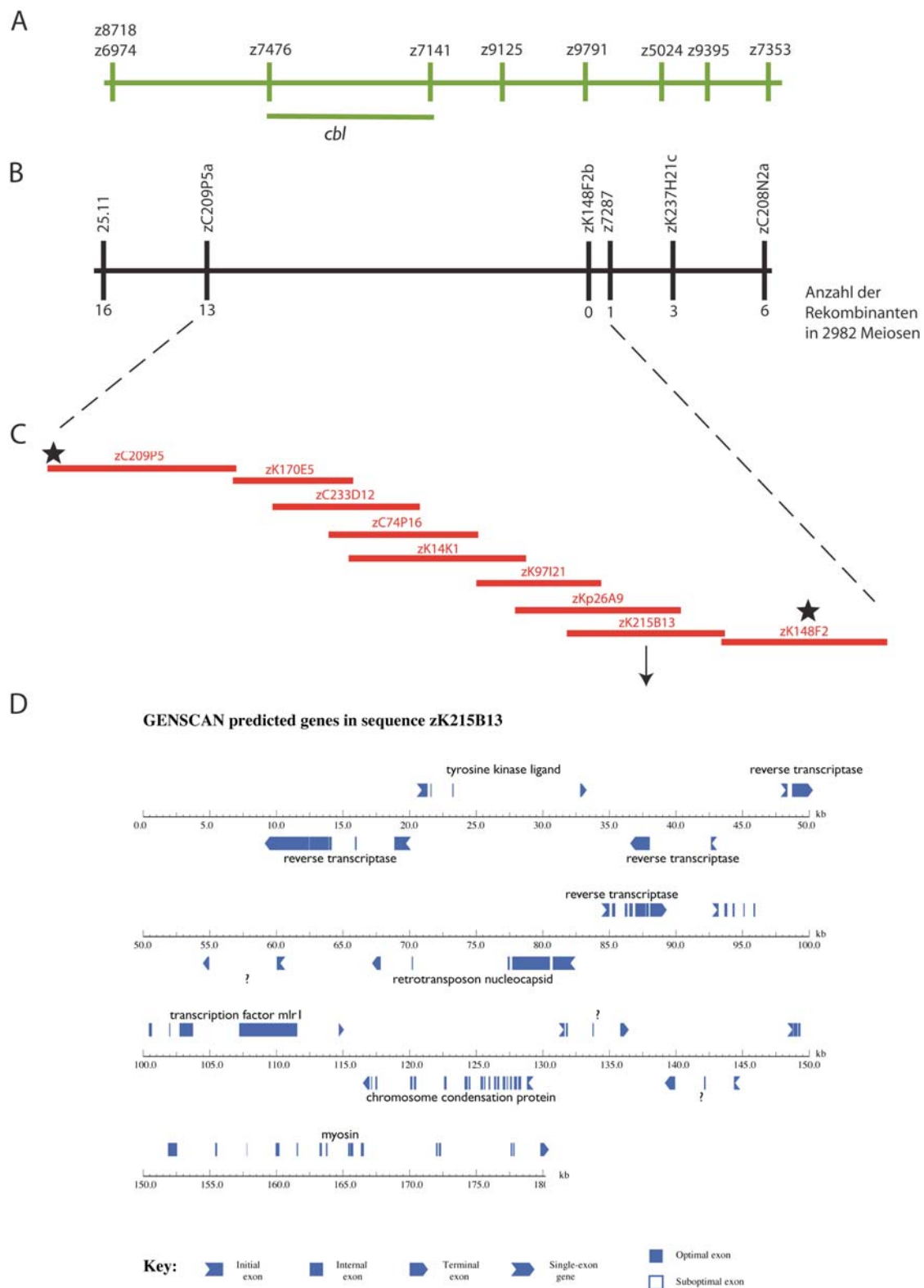


Abb. 11: Positionales Klonieren der Mutante *creature from the black lagoon*. **A:** Vereinfachter Ausschnitt der Tübingen Map mit der ungefähren Lage verwendeter Marker. Angaben in centiMorgan. **B:** Anordnung der Microsatellite-Marker, die in der *cbf*-Region liegen. **C:** Montage der BAC-Sequenzen in der Region zwischen den letzten Markern. Die ungefähre Lage der Marker auf den BACs ist mit einem Stern gekennzeichnet. **D:** Ausgabe der Ergebnisse des Programms Genscan (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>): Open Reading Frames auf dem BAC zK215B13. Angemerkt sind auch die Ergebnisse des Blast-Searchs mit den ausgegebenen Sequenzen (ungefährer Name des Gens mit der höchsten Übereinstimmung).

3.2.4 Contig-Identifikation durch ESTs

Anhand von EST-Sequenzen, die auf der Tübingen-Map verzeichnet sind, konnten einzelne kurze Contigs genomischer DNA identifiziert werden, indem sie gegen die veröffentlichte Genom-Sequenz “geblastet” wurden. Diese kurzen Stücke genomischer Sequenz wurden auf das Vorhandensein von Polymorphismen untersucht, die zur Generierung von Markern verwendet werden können.

3.2.5 SNP-Identifikation

Durch Sequenzierung wurden die gefundenen Contigs auf SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) untersucht, die in TüLF- und WIK-DNA verschieden sind.

Marker 25.11 wurde so gefunden. Dieser Marker nutzt eine nur in WIK vorhandene Restriktionsschnittstelle, die auf einem SNP beruht. Nach einer PCR-Reaktion mit genomischer DNA von Einzelembryonen musste das Produkt noch mit dem Enzym Rsa I geschnitten werden, um so die Herkunft der genomischen Sequenz des jeweiligen Embryos zu bestimmen.

SNPs die keine Restriktionsschnittstellen erzeugen, erfordern die Sequenzierung der genomischen DNA der Einzelembryonen. Diese ist aber nur sehr begrenzt verfügbar und die resultierenden Sequenzen waren qualitativ nicht ausreichend, um sie auszuwerten. Auch das Subklonieren in Vektoren bringt hier keinen Vorteil, da in den Sequenzen der rekombinanten Embryonen beide Basenpaare nachgewiesen werden müssen. Die subklonierte DNA enthält jedoch immer nur die Sequenz eines Chromosoms. Hier wäre es notwendig, viele Klone zu generieren, um rekombinante DNA nachzuweisen.

3.2.6 BAC-Sequenzen und Microsatellite Marker

Die bisher verwendeten Methoden waren sehr materialintensiv und wenig effizient. Auf Grund der wenigen bekannten genomischen DNA-Sequenzen in dem betreffenden Bereich war es aber kaum möglich, die Sequenzen für Marker auszuwählen, die eine größere Wahrscheinlichkeit für Polymorphismen aufweisen.

Die Sequenzierung des Zebrafisch-Genoms beruht auf zwei Strategien - einerseits das Shotgun-Sequencing und andererseits das Sequenzieren von genomischen Libraries - die miteinander kombiniert werden. Diese Sequenzen wurden auch separat zugänglich gemacht. Die fertigen und fast fertigen BAC-Sequenzen sind mit BLAST durchsuchbar und außerdem sind die Contigs einsehbar, die durch das Fingerprinting erstellt wurden (die so genannten fpc-Contigs). Dies bot die Möglichkeit, mit den Markern/ESTs der Tübingen Map und den kurzen Sequenzen des Genom-Assembly nach BAC-Sequenzen zu suchen, die für die Generierung neuer Marker verwendbar waren. Die Sequenzierung der BACs schritt schnell voran und die Contigs der fpc-Database sowie die Sequenzen der BACs waren qualitativ gut.

Anhand der Sequenzen auf der Tübingen-Map wurden BACs und BAC-Fragmente identifiziert, die in der Region der Mutation lagen. Diese Sequenzen und weitere, mittels BLAST-Search und fpc-Contigs identifizierte, wurden per Hand zu großen Abschnitten genomischer DNA zusammengefügt und auf Microsatellite-Repeats durchsucht, die sehr gut für SSLP-Mapping geeignet waren.

Die Strategie, Microsatellite-Marker zu erstellen, war sehr erfolgreich, die Region der Mutation konnte schnell eingegrenzt werden (Marker siehe Tabelle).

Parallel konnte die PCR optimiert werden und es wurde auf kommerziell erhältliche Produkte gewechselt, wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben. Dies führte dazu, dass weitere auf der Tübingen Map befindliche Marker verwendet werden konnten. Es stellte sich heraus, dass Marker z7287 der Mutation sehr nah war (0,01 cM).

3.2.7 BAC-Assembly

Die in der *cbl*-Region liegenden BACs und BAC-Contigs wurden mit Hilfe von BLAST-Searches mit ihren Enden in eine Reihenfolge gebracht. Die Richtigkeit der Alignments konnte anhand der Marker bestätigt werden. Es blieb aber eine Lücke, die nicht mit den BAC-Sequenzen zu schließen war.

Der Marker z7287, der nur noch 0,01 cM von der Mutation entfernt lag, konnte auf keiner der genomischen Sequenzen lokalisiert werden. Alle anderen Marker lagen weiter entfernt. Somit waren alle mittels Tübingen-Map und BLAST-Search identifizierten BAC-

Contigs ebenfalls weiter entfernt. Die Enden der letzten BACs lieferten auch beim BLAST-Search keine weiteren BACs (Abb. 11B).

Die Mutation lag genau in einer Lücke zwischen zwei Markern, in der Nähe von Marker z7287, auf einem nicht bekannten Abschnitt genomischer DNA.

3.2.8 BAC-Library-Screen

Um dieses fehlende Stück genomischer DNA zu finden, wurde die primäre BAC-Library CHORI-211 mit dem Marker z7287 gescreent. Per PCR wurde versucht, einen BAC zu identifizieren. Dies gelang jedoch nicht, d. h. es wurde auf keinem der DNA-Pools eine positive PCR-Reaktion detektiert. Es hatte sich schon bei Durchsicht der bekannten, bereits veröffentlichten BAC-Sequenzen gezeigt, dass mittlerweile fast das gesamte Genom sequenziert war und der Marker eventuell auf einem DNA-Abschnitt lag, der nicht in den Libraries erfasst war.

Mit einem Marker der anderen Seite wurden auf mehreren DNA-Pools positive PCR-Reaktionen vermerkt, die Bestellung der sekundären Librarys wurde jedoch erst einmal zurückgestellt, da dieser Marker in größerer Entfernung zur Mutation liegt, und somit mehrere Schritte zur Ermittlung des letzten BACs notwendig geworden wären.

3.2.9 Die fünfte Montage des Zebrafisch Genoms (Zv5)

Auch der mittlerweile herausgegebene fünfte Assmby des Zebrafisch-Genoms lieferte nicht das fehlende DNA-Stück.

Auf der Montage-Sequenz des Zebrafisch-Genoms werden mit Hilfe des Programms “Ensembl” Gen-Voraussagen erstellt, die zusammen mit bekannten Genen, ESTs, und vielen weiteren Angaben auf der Ensembl-Wepage angezeigt werden und durchsuchbar sind.

Mit der fünften Montage des Zebrafisch-Genoms waren mehr Sequenzen der *cbf*-Region auf Chromosom eins lokalisiert worden, die vorher zum Teil an anderer Stelle oder überhaupt nicht eingeordnet waren. Die darauf generierten Gen-Voraussagen könnten weitere Anhaltspunkte für die Zusammenstellung der Sequenz der *cbf*-Region liefern, da sie mit anderen Genomen verglichen werden können. Die gleiche Reihenfolge von Genen bei verschiedenen Organismen, die so genannte Syntänie, könnte ein Anhaltspunkt für die Identifikation des fehlenden DNA-Stückes sein.

3.2.10 Syntänien mit *Tetraodon nigroviridis* und Mensch

Es zeigte sich auch, dass die Abfolge der Gene bei dem neu sequenzierten Genom von *Tetraodon nigroviridis* (ein Pufferfisch) und Zebrafisch in dieser Region sehr ähnlich ist. Auch beim Menschen im Vergleich mit dem Zebrafisch fanden sich deutliche Syntänien. Die Reihenfolge der Gene in Richtung der Mutation aus einer Richtung war bei allen drei Genomen exakt gleich, aus der anderen Richtung war die Reihenfolge der Gene teilweise invers. Dies war ein Hinweis auf einen Fehler in der Reihenfolge des BAC-Alignments.

3.2.11 BAC-Alignment und Verifikation durch zK148F2b

Eine genaue Analyse der BAC-Sequenzen zeigte, dass das letzte Gen, das beim Zebrafisch vor der fehlenden DNA-Sequenz lokalisierte, nicht vollständig war. Bei diesem Gen handelte es sich um *slit2*, das stark konserviert ist und bei verschiedenen Organismen nahezu identisch. So konnte festgestellt werden, dass das erste Exon nicht auf dem letzten vorhandenen BAC lokalisiert. Durch BLAST-Search mit dem ersten Exon des humanen *slit2* konnte ein BAC (zK148F2) in der Sanger-Center fpc-Database identifiziert werden, auf dem das erste Exon des *slit2* vom Zebrafisch lokalisiert. Durch BLAST-Search mit den Enden dieses BACs konnten in einer Richtung weitere BACs angehängt werden. Hierdurch ergab sich, dass in der fpc-Database Fehler aufgetreten waren. Die fehlenden BACs fanden sich in umgekehrter Reihenfolge auf der anderen Seite der Mutation wieder. Auf Grund der relativ großen Abstände der Marker in diesem Bereich wurde dieser Fehler jedoch nicht durch SSLP-Analyse aufgedeckt. Diese BACs waren beim Mapping übersprungen worden, da auch eigene BLAST-Searches mit den Enden die gleiche Reihenfolge wie in der fpc-Database ergeben hatten.

Durch den Marker zK148F2b konnte die Richtigkeit des Alignments bestätigt werden. Es ergaben sich keine Rekombinanten mehr.

3.2.12 Identifikation von Open Reading Frames durch Genscan

Mit dem online-Programm Genscan (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) wurden die dem Marker zK148F2b am nächsten liegenden BACs auf vorhandene Gene analysiert. Auf dem BAC zK148F2 wurden keine Gene gefunden, auf zK215B13 identifizierte das Programm einige Open Reading Frames, mit denen dann BLAST-Searches durchgeführt wurden. Eine Übersicht der Ergebnisse ist in Abb. 11D zu sehen.

3.2.13 *In situ* Hybridisierung

Anhand der vorausgesagten Gensequenzen wurden per BLAST-Search bekannte mRNA- oder EST-Sequenzen identifiziert und zur Verifikation der Expression der Gene und zur Generierung von *in situ*-Sonden verwendet.

Die Sonde CV119151 (Name des ESTs), Teil der Gensequenz von CAP-G, eines Mitglieds des Condensin-Komplexes, zeigte ein Expressionsmuster, das mit dem Phänotyp der Mutante *cbl* in Einklang zu bringen war (Abb. 15). Besonders auffällig war die Expression in der Retina bei einem Alter von drei Tagen. In der *cbl*-Mutante finden sich zu diesem Zeitpunkt viele apoptotische Zellen.

3.2.14 Identifizierung des Gens zCAP-G

Die vorausgesagte Gensequenz wurde mittels BLAST-Search und resultierenden ESTs überprüft und mit anderen Sequenzen verglichen. Die größte Übereinstimmung bestand mit der humanen Condensin-Untereinheit hCAP-G, Accession No. AF331796 (GenBank™/EBI Data Bank), sowie XCAP-G (AF111423) und Cnd3 und Ycg1 aus Hefen (AB030214 bzw. YDR325W). Die Protein-Sequenz konnte an Hand von ESTs bestätigt werden. Es besteht jedoch Unsicherheit für die 5'-UTR, die nicht amplifiziert werden konnte.

3.2.15 Sequenzierung

Es wurde begonnen, die vorausgesagte Gensequenz mittels PCR zu überprüfen und zu sequenzieren. So konnte eine C- zu T-Punktmutation identifiziert werden, die an Position 493 des Proteins zu einem Stop-Codon führt. Hierzu wurden 4 unabhängige PCR-Reaktionen von wildtypischen TüLF- bzw. mutanten *cbl*-cDNA-Pools (jeweils ca. 50 Embryonen) sequenziert. Bei allen wildtypischen Sequenzen wurde ein Cytosin gefunden, bei allen mutanten ein Thymin.

Auch bei der Sequenzierung genomischer DNA bestätigte sich die Mutation. Es fand sich ein Stop-Codon bei mutanten Einzelembryonen, ein Cytosin bei Wildtypen und bei 8 von 12 Geschwistern der mutanten Embryonen eine Mischung aus beiden Nukleotiden.

3.2.16 Protein-Sequenz und Domänen

Die ermittelte Protein-Sequenz weist laut SMART-Programm drei HEAT-Domänen (Stand Juli 2007), eine UvR(UV-Repair)-Domäne und eine Pleckstrin Homology Domäne auf.

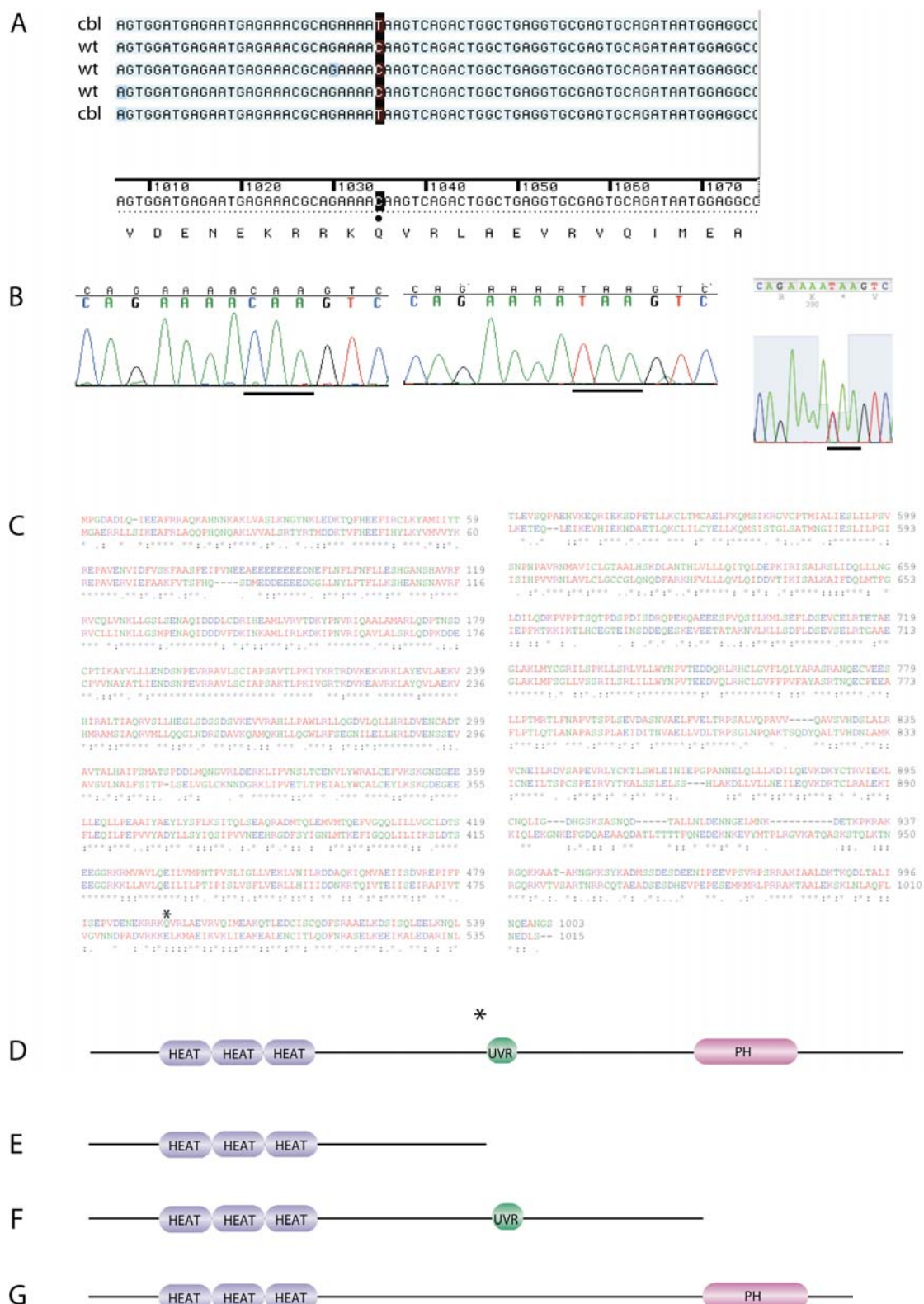


Abb. 12: Die Sequenz von zCAP-G. **A:** Gen-Sequenz von *zcap-g* von zwei *cbl*- und zwei wt-Embryonen. **B:** Sequenzierung genomischer DNA von wt, *cbl* und *cbl*-Geschwistern. **C:** Protein-Sequenz-Alignment von zCAP-G (oben) und hCAP-G (unten). Asterisk: *cbl*-Mutation. **D, E, F, G:** Die vom Programm SMART ausgegebenen Domänen in zCAP-G und ihre Lage im wt-Protein (D, Asterisk: *cbl*-Mutation), in der *cbl*-Mutante (E), in den PH- (F) und UVR-Deletionskonstrukten (G).

3.2.17 Klonierungen

Es wurde die *zcap-g*-wt-cDNA in einen Expressionsvector (pCS2+ HA) kloniert. Neben der wt-Sequenz wurden Sequenzen mit der *cbl*-Mutation und mit einzelnen fehlenden Domänen kloniert, um sie für die spätere Analyse der Domänen-Funktion verwenden zu können (Abb. 12E, F und G). Alle Sequenzen wurden mit der Sequenz für ein HA-Tag versehen, um translatierte Proteine in immunhistochemischen Färbungen und Western-Blots detektieren zu können.

Ziel der Struktur-Funktions-Analyse soll es sein, die Funktion der deletierten Domänen zu untersuchen. Die UvR-Domäne wurde deletiert, da eine Funktion für die DNA-Bindung vermutet wird. Die PH-Domäne wurde deletiert, da eine Assoziation des Proteins an Membranen oder andere Proteine vermutet wird (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/do_annotation.pl?DOMAIN=ph). Beide Domänen könnten also eine Rolle bei der Lokalisation des Proteins während des Zellzyklus spielen.

3.2.18 Der *cbl*-Phänotyp konnte durch RNA-Injektion nicht gerettet werden

Um zu bestätigen, dass die klonierte Mutation für den beschriebenen Phänotyp verantwortlich ist, kann durch Injektion der wt-RNA versucht werden, den Phänotyp zu retten. Eine weitere Möglichkeit, die Mutation zu bestätigen, wäre die Erzeugung des Phänotyps durch Injektion mutanter RNA.

Die wt-Sequenz wurde in mRNA transkribiert und Embryonen im Einzellstadium injiziert. In wt-Embryonen trat kein toxischer Effekt auf. Aber auch in *cbl*-Embryonen war kein Effekt zu beobachten, d. h. es ergab sich kein Rescue.

Mit ersten immuncytochemischen Färbungen wurde versucht, Protein nachzuweisen. Die Färbung mit dem HA-Antikörper ergab jedoch keine Unterschiede bei injizierten und nicht injizierten frühen Embryonen.

Auch die Injektion der RNA mit *cbl*-Mutation hatte keinen Effekt.

3.2.19 Durch Injektion von Morpholino-Oligonukleotiden können *cbl*-Phänotypen erzeugt werden

Zur Überprüfung, ob die Mutation in *zcap-g* für den Phänotyp in den *cbl*-Embryonen verantwortlich ist, wurde ein Morpholino-Oligonukleotid verwendet, das gegen das Start-Codon (ATG) der RNA gerichtet ist. Die Gelege wurden jeweils zur Hälfte mit Morpholino injiziert.

Die injizierten Embryonen haben starke Defekte (Abb. 13H). Neben einem *cbl*-ähnlichen Phänotyp mit kleinen Augen ist die Entwicklung insgesamt verzögert. Oft treten auch perikardiale Ödeme auf (Abb. 13H).

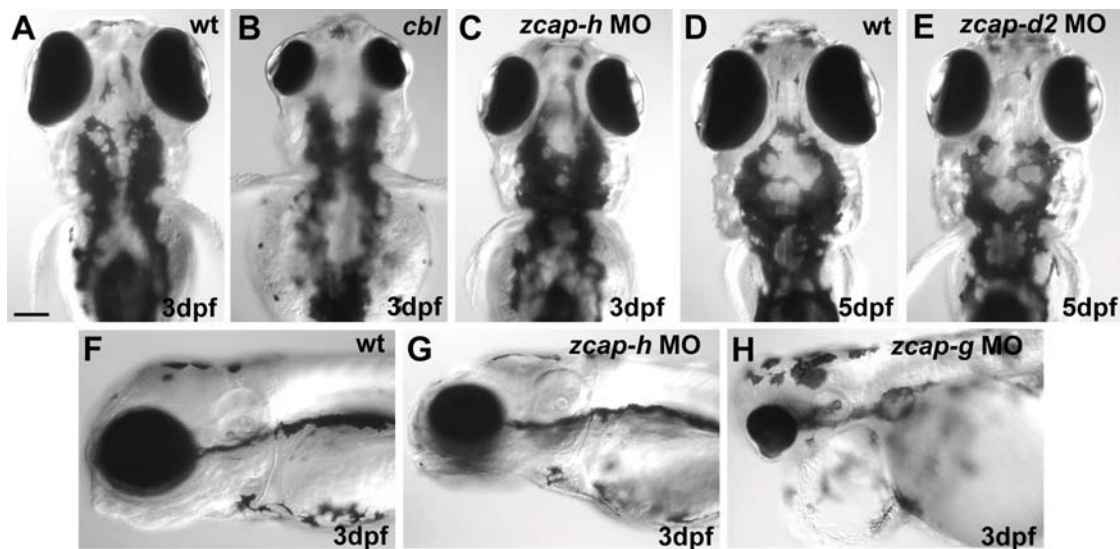


Abb. 13: Mit Morpholino-Oligonukleotiden gegen Condensin-I-Gene injizierte Embryonen. **A und F:** wt-Embryonen im Alter von drei Tagen, **B:** *cbl*-Embryo im Alter von drei Tagen, **C und G:** *zcap-g* MO injizierte Embryonen im Alter von drei Tagen, **D:** wt-Embryo im Alter von fünf Tagen, **E:** *zcap-d2* MO injizierter Embryo im Alter von fünf Tagen, **H:** *zcap-g* MO injizierte Embryonen im Alter von drei Tagen. A bis E: Dorsalansicht, anterior oben. F bis H: Lateralansicht, anterior links, dorsal oben. Größenbalken 100 µm.

Es wurden auch Morpholinos gegen die beiden anderen Gene für regulatorische Untereinheiten des Condensin-I-Komplexes (*zcap-b* und *zcap-d2*) injiziert. Beide Morpholinos führen zu einem der *cbl*-Mutante sehr ähnlichen Phänotyp (Abb. 13C, E und G). *zcap-b*-MO injizierte Embryonen haben bei 3 dpf deutlich kleinere Augen als der wt

(Abb. 13A, C, F und G). Die Injektion von *zcap-d2*-Morpholino erzeugt einen etwas schwächeren Phänotyp und ist erst bei 5 dpf deutlich zu sehen (Abb. 13D und E).

Um die Auswirkungen der MO-Injektion auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurden, DAPI-Färbungen der Augen angefertigt. Die mit *zcap-d2*- und *zcap-h*-MO injizierten Embryonen weisen stark kondensierte Zellkerne auf (Abb. 14 B und C), die mit *zcap-g*-MO injizierten jedoch nur sehr wenige (Abb. 14A). Die Entwicklung der mit *zcap-g*-MO injizierten Embryonen scheint verzögert zu sein, da die Retina eher einer wt-Retina bei 24 hpf ähnelt (Abb. 14A, vgl. Abb. 27I).

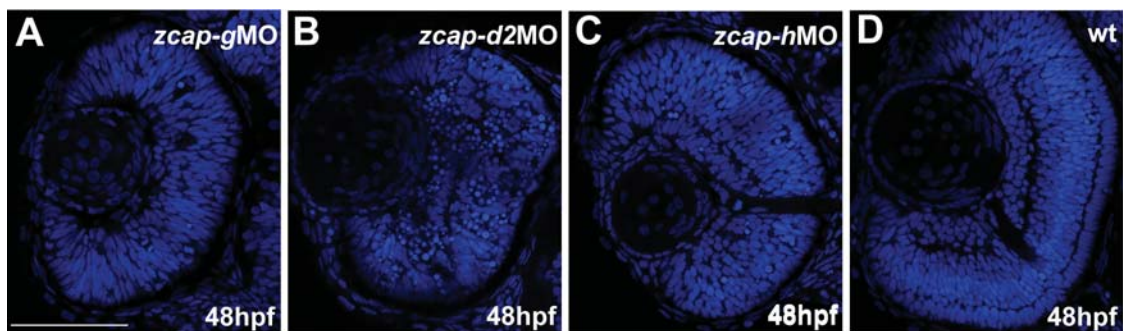


Abb. 14: DAPI-Färbungen von Retinae von mit verschiedenen Morpholino-Oligonukleotiden injizierten Embryonen im Alter von 48 hpf. **A:** *zcap-g*-Morpholino injiziert. **B:** *zcap-d2*-Morpholino injiziert. **C:** *zcap-h*-Morpholino injiziert. **D:** wt-Retina Transversalschnitte, dorsal oben. Größenbalken 100 μ m.

3.3 Phänotypische Charakterisierung

3.3.1 Expression von *zcap-g*

zcap-g ist in proliferierenden neuronalen Geweben exprimiert (Abb. 15A bis F). Im 20-Somiten-Stadium, ca. 19 hpf (Abb. 15A und B) und bei 24 hpf (Abb. 15C und D) ist *zcap-g* im Gehirn und dem Notochord exprimiert. Besonders deutlich ist in diesem Alter auch die Expression im Auge (Abb. 15C). Bei 36 hpf ist die Expression schon deutlich zurückgegangen, zeigt sich aber noch im Auge und vielen Teilen des Gehirns (Abb. 15E). Bei 36 hpf ist *zcap-g* in Teilen des Gehirns wie Tectum (Tect) und Midbrain-Hindbrain-Boundary (MHB) und spät proliferierenden neuronalen Geweben wie der Ohrenplakode (OP) exprimiert (Abb. 15F). Im Auge ist eine schwache Expression nur noch in der CMZ vorhanden.

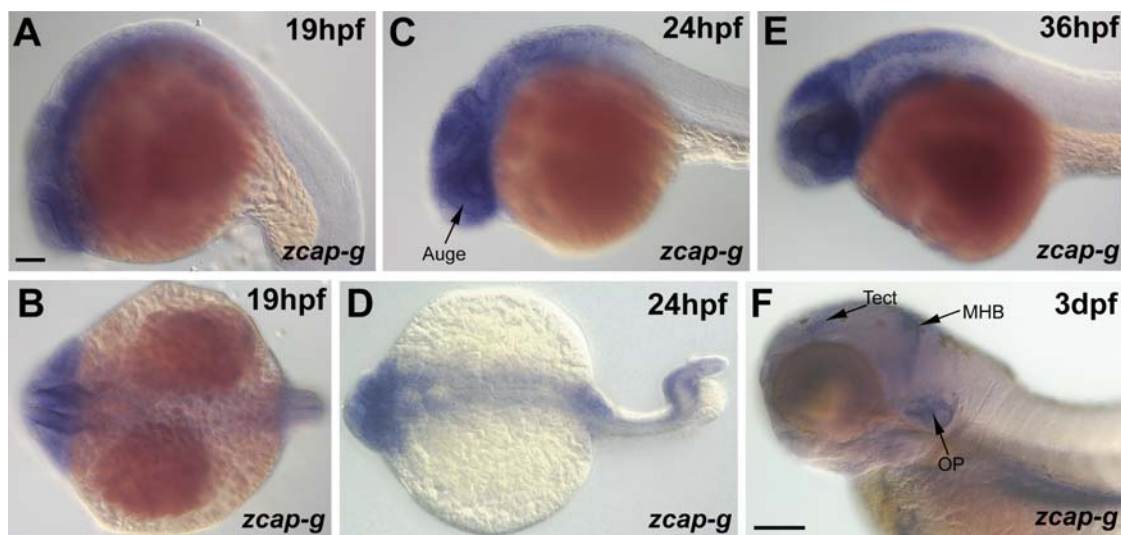


Abb. 15: *In situ*-Hybridisierungen gegen *zcap-g*. **A und B:** Embryonen im 20-Somiten-Stadium, ca. 19 hpf, **C und D:** Embryonen im Alter von 24 hpf, **E:** Embryo im Alter von 36 hpf, **F:** Embryo im Alter von drei Tagen. A, C, E und F: Lateralansicht, anterior links, dorsal oben. B und D: Dorsalansicht, anterior links. Größenbalken 100 μ m. Erläuterungen im Text.

Des Weiteren wurde ein Antikörper gegen das humane CAP-G im Zebrafish getestet, um die Expression und Lokalisation des Proteins bestimmen zu können. Dieser Antikörper zeigte aber weder in immunocytochemischen Färbungen an Augen noch im Western Blot eine Kreuzreaktion beim Zebrafisch.

3.3.2 Die Expression von *zcap-g* korreliert mit dem Muster der Zellproliferation

Um die Expression von *zcap-g* in proliferierenden Neuronen genauer zu untersuchen, wurden *in situ*-Hybridisierungen durchgeführt und mit der Expression von Zellzyklus-Markern verglichen (Abb. 16). *pcna* (proliferating cell nuclear antigen) ist in proliferierenden Zellen exprimiert, die noch keine Differenzierung begonnen haben. *ath5* (Zebrafisch atonal) kennzeichnet Neuronen, die noch nicht vollständig differenziert sind und ist einer der ersten Marker für Neurogenese in der Fisch-Retina (Masai et al., 2000). Im Unterschied dazu ist *elavl3* nur in voll ausdifferenzierten Neuronen exprimiert und dient als früher Marker für Neuronen in der Ganglienzellschicht und der inneren Kernschicht in der Retina (Ekstrom und Johansson, 2003; Kim et al., 1996).

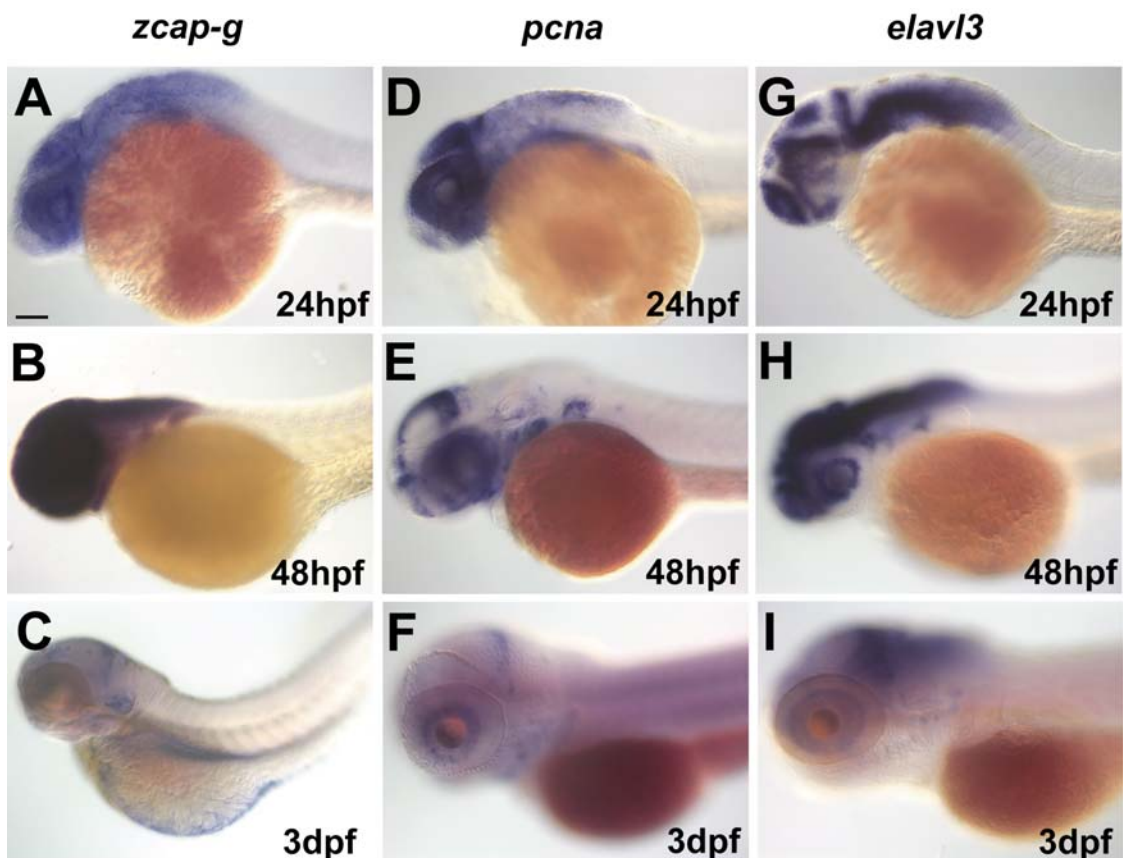


Abb. 16: Expression von *zcap-g* (A, B, C) im Vergleich mit Markern verschiedener Stadien der Neurogenese: *pcna* (D, E, F), *ath5* (G, H, I), *elavl3* (J, K, L). Lateralansicht, anterior links. Größenbalken 100 μ m.

Bei 24 hpf entspricht die Expression von *zcap-g* der von *pcna* und überlappt nur wenig mit der von *elavl3* (Abb. 16A bis I). Die Expression von *zcap-g* ist demzufolge auf proliferierende Zellen des Nervensystems beschränkt und nimmt mit ihrer Differenzierung ab.

Auch in späteren Stadien (Abb. 17 A und D) entspricht die Expression von *zcap-g* der von *pcna*.

3.3.3 Die Neurogenese in *cbl*-Mutanten ist nicht verzögert

In *cbl*-Retinae findet die Differenzierung der unterschiedlichen Zelltypen statt. Um die Neurogenese genauer zu untersuchen, wurden *in situ*-Hybridisierungen mit Markern für verschiedene Stadien der Neurogenese in wt- und *cbl*-Embryonen durchgeführt.

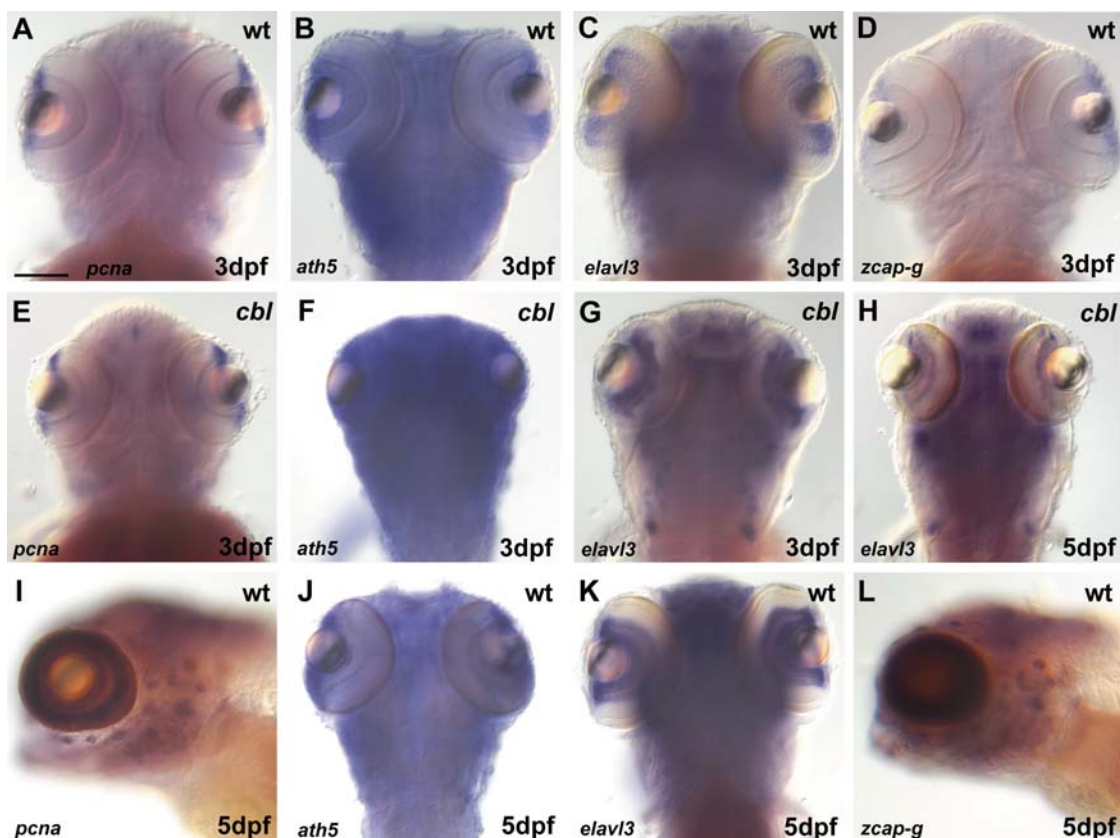


Abb. 17: Die Neurogenese in *cbl*-mutanten Retinae ist nicht verzögert. **A, E, I:** Expression von *pcna* in wt (A und I) und *cbl* (E). **B, F, J:** Expression von *ath5* in wt (B und J) und *cbl* (F). **C, G, K, H:** Expression von *elavl3* in wt (C und K) und *cbl* (G und H). **D und L:** Expression von *zcap-g* in wt. A bis G: 3 dpf, H bis L: 5 dpf. A bis H, J und K: Dorsalansicht, anterior oben. I und L: Lateralansicht, anterior links. Größenbalken 100 µm. Erläuterungen im Text.

Bei 3 dpf ist *pcna* in proliferierenden Zellen ausschließlich in der CMZ (dem Bereich der Retina, der die Stammzellen enthält) exprimiert (Abb. 17A). Auch in *cbl*-Embryonen ist die Proliferation auf die CMZ begrenzt (Abb. 17E). Neuronen, die sich noch nicht vollständig ausdifferenziert haben, sind bei wt- und *cbl*-Embryonen in einem Bereich zu finden, der mit der CMZ überlappt, aber etwas darüber hinausgeht (Expression von *ath5*, Abb. 17B und F). Auch bei einem Alter von 5 dpf bleibt dieses Muster erhalten (Abb. 17J). *elavl3* (voll ausdifferenzierte Neuronen) ist dagegen in der Ganglienzellschicht, sowohl bei wt (Abb. 17C) als auch bei *cbl* (Abb. 17G), exprimiert. Die Expression von *elavl3* nimmt bei Wildtypen zwischen 3 und 5 dpf etwas zu (Abb. 17C und K). Bei *cbl*-Mutanten ist der Vergleich auf Grund der verschiedenen ausgeprägten Phänotypen schwierig (Abb. 17G und H). Bei 3 Tage alten wt-Embryonen ist *zcap-g* in proliferierenden Zellen exprimiert, in einem Bereich, dessen Ausdehnung ungefähr zwischen der der *pcna*- und der *ath5*-Expression liegt (Abb. 17D). Dies wird auch deutlich bei der Expression von *pcna* und *zcap-g* in Lateralansicht bei 5 Tage alten Embryonen (Abb. 17I und L).

Die Retinogenese bei *cbl*-Embryonen entspricht dem wildtypischen Muster und ist (im Gegensatz zu den mit *zcap-g*-Morpholino injizierten Embryonen) nicht verzögert.

3.3.4 Die Zahl der Zellen in der neuronalen Retina ist in *cbl*-Mutanten reduziert

Um die Defekte der Mutante *creature from the black lagoon* besser zu verstehen, wurde die Phänotyp-Analyse auf die Retina begrenzt, da sie gut unterscheidbare Zelltypen enthält und das Muster ihrer Proliferation und Differenzierung bekannt ist (Easter & Malicki, 2002).

Da das auffälligste Merkmal der Mutante – die kleinen Augen – bei einem Alter von drei Tagen auftritt, wurden zunächst Augen dieses Alters untersucht. Eine DNA-Färbung mit DAPI zeigte, dass die Zellschichten ausgebildet werden, wenngleich sie weniger Zellen enthalten und unorganisiert erscheinen (Abb. 18B).

Bei der Zählung der Zellen wurde festgestellt, dass eine Reduktion der Zellzahl in der neuronalen Retina vorliegt. Dazu wurden optische Schnitte von mit DAPI gefärbten transversalen Vibratom-Schnitten ausgewählt, die nach dem größten Durchmesser der Linse zu urteilen mittig durch die Retina führen. In diesen wurden dann sämtliche Zellkerne mit Photoshop markiert und gezählt (Abb. 18C).

Die Schnitte durch die Retina von wildtypischen Tieren im Alter von 3 dpf wies durchschnittlich 1060 Zellen auf (n=6), die von *cbl*-Mutanten durchschnittlich 456 Zellen (n=9). Das entspricht einer Reduktion um 57 %.

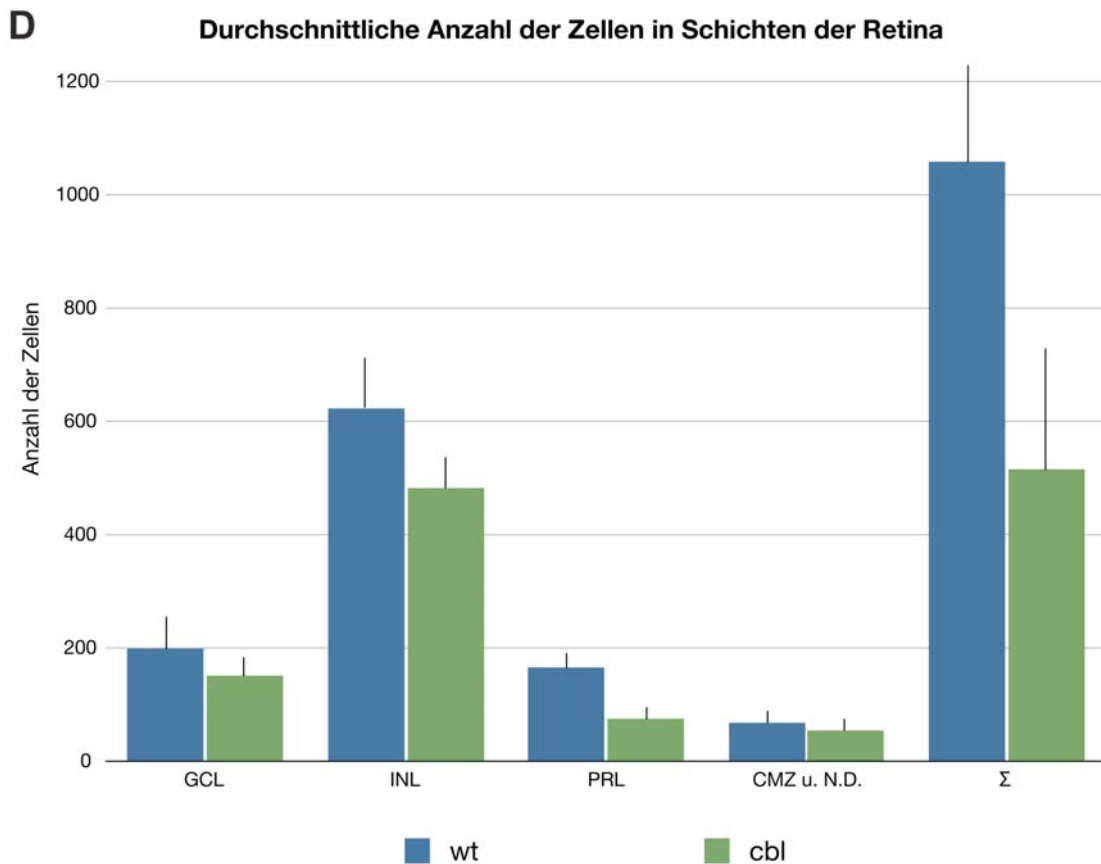
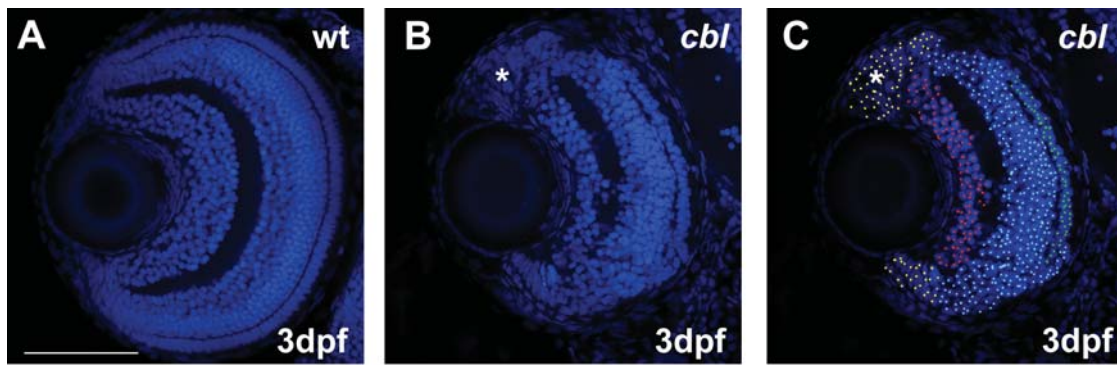


Abb. 18: Die Zahl der Zellen in der neuronalen Retina von *cbl*-Mutanten ist reduziert. **A, B:** Mit DAPI gefärbte optische Schnitte durch Retinae von wt (**A**) und mutanten (**B**) Embryonen im Alter von 3 dpf. **C:** Mit verschiedenfarbigen Punkten markierte Zellen der verschiedenen Schichten der Retina aus (**B**). **D:** Balkendiagramm der durchschnittlichen Anzahl der Zellkerne in 6 (wt) bzw. 9 (*cbl*) optischen Schnitten durch 3 dpf-Retinae: Ganglienzellschicht (GCL), Innere Zellkernschicht (INL), Photorezeptor-Schicht (PRL) Ciliary Marginal Zone (CMZ) inklusive angrenzende Zellen, die nicht sicher einer Schicht zugeordnet werden können (N.D.), sowie der Gesamtzahl der Zellen pro Retina (Σ). **A-C:** Transversale Vibratomschnitte, der Asterisk zeigt die CMZ, Größenbalken 100 μm . **D:** Die Fehlerbalken zeigen die Standard-Abweichung.

Da die Retinae der mutanten Embryonen eine Schichtung wie sie wildtypischen Retinae entspricht aufweisen, wurde in allen Schnitten auch die Anzahl der Zellen in den verschiedenen Schichten gezählt. Die Zahl der Ganglienzellen in wildtypischen Retina-Schnitten betrug durchschnittlich 253 Zellen ($n=6$) und in Schnitten durch mutante Augen betrug die Zahl durchschnittlich 85 ($n=9$), was einer Reduktion um 66 % entspricht. In der Schicht der Zellkerne von bipolaren, horizontalen und amakrinen Zellen (inner nuclear layer, INL) wurden durchschnittlich 623 Zellkerne in wildtypischen Augen und durchschnittlich 268 in *cbl*-Embryonen gezählt, in letzteren war die Anzahl also um 57 % geringer. Auf eine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Zelltypen innerhalb des INL wurde hier verzichtet, da diese in den mutanten Augen anhand der Zellkerne nicht sicher unterscheidbar sind. In der Photorezeptor-Schicht waren in wildtypischen Augen durchschnittlich 166 und in *cbl*-Augen 43 Zellkerne vorhanden, was einer Reduktion um 74 % entspricht. Die Anzahl der Zellen der Ciliary Marginal Zone und angrenzende Zellen, die keiner Schicht zugeordnet werden konnten, betrug durchschnittlich 70 (Wildtyp) bzw. 60 (*cbl*), war also in mutanten Augen mit 24 % weniger stark reduziert.

Die Zahl der Zellen in *cbl*-mutanten Retinae ist um mehr als die Hälfte reduziert. Diese Reduktion betrifft alle Schichten der neuronalen Retina.

3.3.5 Die Zelltypen der Retina werden ausdifferenziert

In den vorangegangenen Experimenten ließ sich erkennen, dass die typische Schichtung der neuronalen Retina in den *cbl*-Mutanten zwar ausgebildet wird, die Zellkerne aber oft eine veränderte Form aufweisen (Abb. 10F). Um zu untersuchen, ob die verschiedenen Zelltypen der neuronalen Retina gebildet werden und sich ausdifferenzieren oder einzelne oder alle Zellen in einem undifferenzierten Zustand verbleiben, wurden Färbungen mit für verschiedene Zelltypen spezifischen Antikörpern durchgeführt.

Ausgewählt wurden *zn-5*, ein Marker für die sich zuerst (ab ca. 37 hpf) differenzierenden Ganglienzellen, ein Marker (*zpr-1*) für die sich nach 44 bis 48 hpf differenzierenden Photorezeptoren und *zfr-1*, ein Marker für die sich zuletzt differenzierenden Müller-Glia-Zellen (Abb. 19). Die Färbungen wurden an drei Tage alten Embryonen vorgenommen.

Der Marker *zn-5* (University of Oregon Zebrafish International Ressource Center, ZIRC) bindet spezifisch an α -Neuroilin/DM-GRASP – ein Transmembran-Immunglobulin, das von Ganglienzellen der Retina und anderer neuronaler Strukturen exprimiert wird (Fashena und Westerfield, 1999). In Augen von drei Tage alten *cbl*-Embryonen sind Ganglienzellen differenziert und befinden sich in der Ganglienzellschicht im inneren Bereich der Retina (Abb. 19B). Ebenso ist deutlich zu sehen, dass der Sehnerv, der von Axonen der Ganglienzellen gebildet wird, die Ganglienzellschicht verlässt (Abb. 19B).

Der Marker *zpr-1* (ZIRC) bindet spezifisch an die Zellmembran rot-grüner Doppel-Zapfen (red/green double cones) (Larison und Bremiller, 1990). Bei 3 dpf sind im

äußeren Bereich der *cbl*-mutanten Retinae Photorezeptoren, welche morphologisch verändert und in der Anzahl reduziert sind (Abb. 19C und D).

Der Marker *zfr-1* (ZIRC) bindet spezifisch an GFAP (glial fibrillary acidic protein), das von Müller-Glia-Zellen exprimiert wird (Marcus und Easter, 1995). In *cbl*-mutanten Retinae differenzieren sich diese Zellen aus und verlaufen wie in wt-Retinae radial (Abb. 19E und F).

Durch immunhistochemische Färbungen konnten Zelltyp-spezifische Marker sowohl in den sich zuerst differenzierenden Ganglienzellen als auch in den sich zuletzt differenzierenden Müller-Glia-Zellen, sowie in Photorezeptoren nachgewiesen werden. Somit weisen die Zellen der neuronalen Retina in *cbl*-Mutanten keine Differenzierungsdefekte auf.

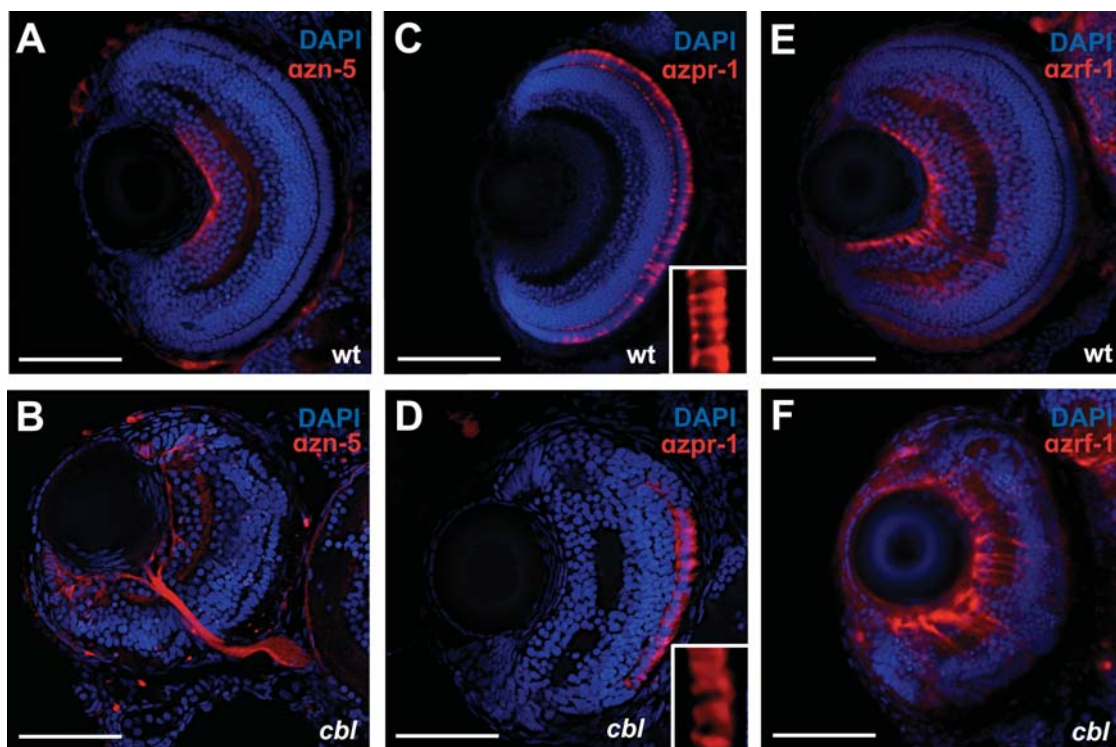


Abb. 19: Die verschiedenen Zelltypen der neuronalen Retina werden in *cbl*-Mutanten gebildet und ausdifferenziert und lassen sich mit spezifischen Antikörpern nachweisen. **A, B:** wt (A) und *cbl*-Retinae (B) im Alter von 3 dpf, gefärbt mit DAPI (Zellkerne, blau) und zn-5 (Ganglienzellen und deren Fortsätze, rot). **C, D:** wt (C) und *cbl*-Retinae (D) im Alter von 3 dpf, gefärbt mit DAPI und zpr-1 (Photorezeptoren, rot). Einfügungen: Vergrößerung einiger Photorezeptoren. **E, F:** wt (E) und *cbl*-Retinae (F) im Alter von 3 dpf, gefärbt mit DAPI und zrf-1 (Müller-Glia, rot). Transversale Vibratomschnitte, dorsal oben. Größenbalken 100 μ m.

3.3.6 Aktivierung von Apoptose im zentralen Nervensystem kennzeichnet *cbl*-Mutanten

Bei Färbungen mit Acridine Orange (AO) an lebenden Embryonen von heterozygot mutanten Eltern traten ab einem Alter von ca. 36 h Tiere auf, die gefärbte Zellen in den Augen aufwiesen (Abb. 20B). Intakte Zellmembranen in lebenden Organismen sind für Acridine Orange nicht permeabel, nur in Zellen, deren Membran beschädigt ist, kann damit die DNA angefärbt werden. Dies ist bei apoptotischen und nekrotischen Zellen der Fall.

Um festzustellen, ob dieser Phänotyp auf die *cbl*-Mutation zurückgeht, wurde die Anzahl der Tiere mit und ohne gefärbte Zellen eines Geleges gezählt. Es wurden alle Embryonen jeweils eines Geleges im Alter von 36 hpf und 48 hpf mit Acridine Orange gefärbt, und jeweils ein Auge jedes Tieres unter dem Mikroskop betrachtet. Im Alter von 36 hpf zeigten 5 von 26 Embryonen von heterozygot mutanten Eltern gefärbte Zellen. Bei 48 hpf zeigten 11 von 45 Embryonen von heterozygot mutanten Eltern mindestens eine mit Acridine Orange gefärbte Zelle in den Augen (Abb. 20C). Dies entspricht jeweils einem Viertel des gesamten Geleges, entsprechend einem rezessiv-zygotischen Erbgang. Um zu bestätigen, dass es sich bei den AO-positiven Tieren um *cbl*-Mutanten handelt, wurde anhand des in der Nähe der Mutation liegenden SSLP-Markers zC209P5a getestet, ob es sich um mutante Embryonen handelt (Abb. 20D, hier gezeigt für die in Abb. 20C gezählten Embryonen im Alter von 48 hpf). Ausnahmslos alle Embryonen mit Apoptose oder Nekrose (die ersten 11 PCR-Reaktionen) weisen nur die (größere) TüLF-Bande auf; alle anderen Embryonen die WIK-Bande oder die WIK- und die TüLF-Bande. Dies bestätigt, dass die Apoptose auf die *cbl*-Mutation zurückzuführen ist.

Durch Färbungen mit DAPI (Abb. 20E und F), mit der TUNEL-Technologie (Abb. 20G und H) oder mit einem Antikörper gegen aktivierte Caspase 3 (Abb. 20I und J) wurde bestätigt, dass es sich in den Augen der mutanten Embryonen um Apoptose handelt.

Zunächst wurden Vibratom-Schnitte von 40 hpf-Embryonen mit DAPI gefärbt. DAPI bindet an DNA und führt zu einer intensiven Färbung der stark kondensierten apoptotischen Zellkerne. Diese sind sowohl im Auge (Abb. 20F, Pfeil) als auch in anderen Teilen des zentralen Nervensystems (Abb. 20F, Pfeilspitzen) zu finden.

Die Färbung mit der TUNEL-Technologie beruht auf an ein Fluorophor gekoppelten dUTPs, die an die Enden von fragmentierter DNA binden. Die DNA-Fragmentierung von apoptotischen Zellen ist sehr viel stärker, als die von nekrotischen Zellen, insofern ist die TUNEL-Färbung ein guter Indikator von Apoptose. Da die Fragmentierung der DNA in der Kaskade der Abläufe nach Aktivierung der Apoptose erst relativ spät auftritt, werden erst Zellen markiert, deren Apoptose schon weiter fortgeschritten ist. Es wurden Embryonen im Alter von 60 hpf für die Färbung ausgewählt. Gefrierschnitte von mutanten Embryonen im Alter von 60 hpf zeigen im Auge eine starke Färbung (Abb. 20H, Pfeil). Auch im Gehirn liegen Zellen mit fragmentierter DNA vor (Abb. 20H, Pfeilspitzen).

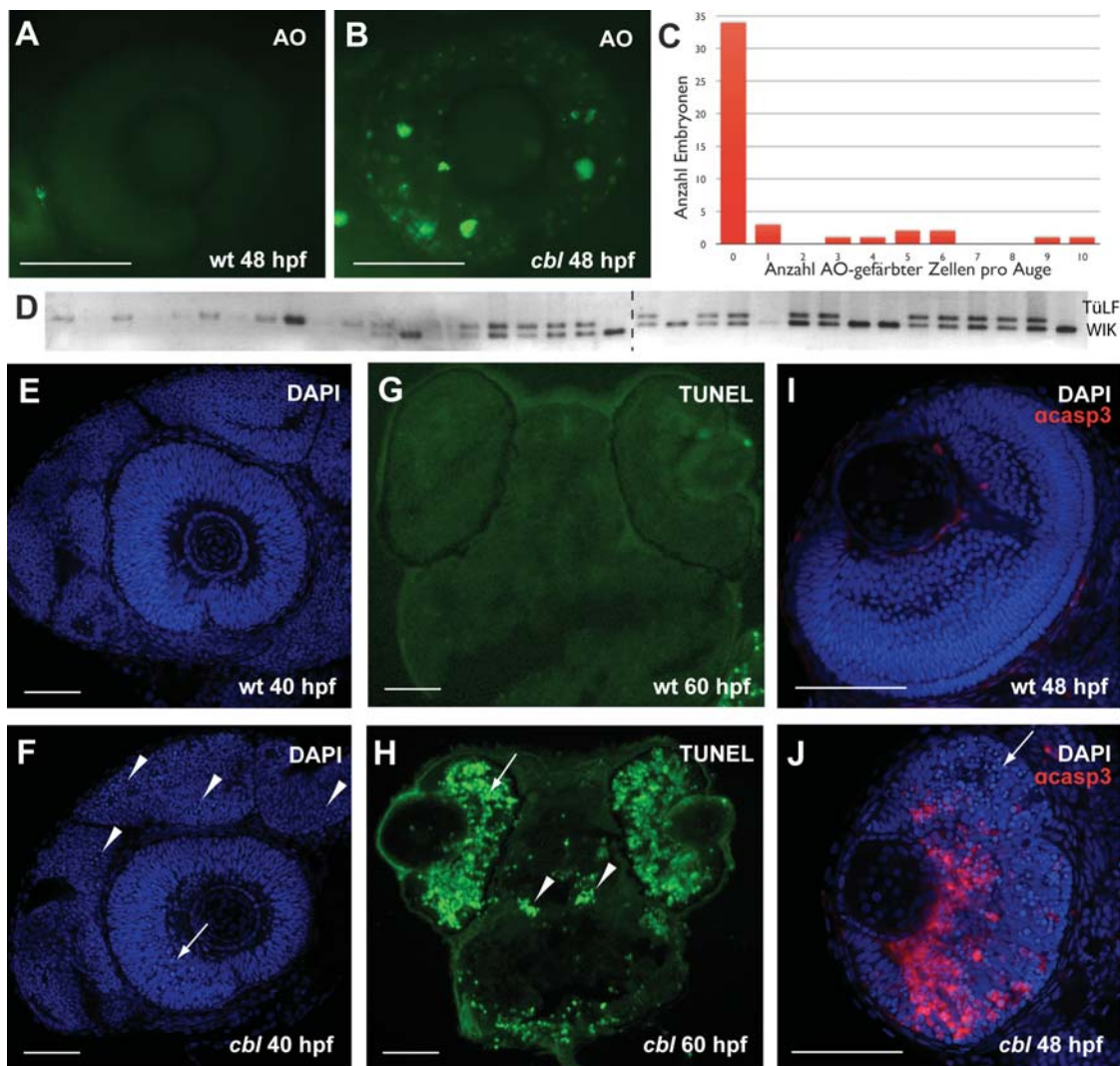


Abb. 20: In *cbl*-Mutanten ist Apoptose in Zellen der Augen und anderen Geweben des zentralen Nervensystems aktiviert. **A, B:** Acridine Orange Färbung an lebenden Embryonen im Alter von 48 hpf, Seitenansicht des Auges. **C:** Balkendiagramm mit Anzahl der Embryonen eines Geleges im Alter von 48 hpf nach Anzahl mit Acridine Orange gefärbten Zellen pro Auge. **D:** SSLP-Analyse der Embryonen des selben Geleges mit dem Marker zC209P5a. Die PCR-Produkte der DNA der Embryonen mit gefärbten Zellen im Auge (Banden 1 bis 11) weisen nur die größere TüLF-Bande, Embryonen ohne gefärbte Zellen in den Augen (Banden 12 bis 35) nur WIK-Banden oder WIK- und TüLF-Banden auf. **E, F:** DAPI-Färbung an sagittalen Vibratomschnitten von 40 hpf Embryonen. Die *cbl*-Mutanten (F) haben sowohl im Auge (Pfeil) als auch in anderen Teilen des zentralen Nervensystems (Pfeilspitzen) stark gefärbte, kreisrunde DNA-Strukturen, die auf Apoptose schließen lassen. **G, H:** TUNEL-Färbung an transversalen Gefrierschnitten von 60 hpf alten Embryonen. Die *cbl*-Mutanten (H) haben Apoptose im Auge (Pfeil) und im ZNS (Pfeilspitzen). **I, J:** Antikörper-Färbungen mit α -active Caspase 3 (rot) an transversalen Vibratomschnitten durch Retinae von 48 hpf alten Embryonen, mit DAPI (blau) gegengefärbt. **A, B:** Seitenansicht, dorsal oben, anterior rechts, **C, D:** Sagittalschnitte, dorsal oben, anterior rechts. **G, H, I, J:** Transversalschnitte, dorsal oben. Größenbalken 100 μ m.

Da sowohl apoptotische als auch nekrotische Zellen fragmentierte DNA aufweisen, wurden Färbungen mit einem Antikörper gegen aktivierte Caspase 3 durchgeführt, welche nur in apoptotischen Zellen aktiviert ist. Es wurden Antikörperfärbungen an Vibratomschnitten im Alter von 48 hpf durchgeführt. Die Augen der Mutanten Embryonen weisen eine deutliche Färbung auf (Abb. 20J). Die Färbung tritt im dorsalen Teil der Retina schwächer auf, obwohl dort Zellen mit starker DAPI-Färbung vermutlich apoptotisch sind (Abb. 20J, Pfeil). Dies könnte an der weiter fortgeschrittenen Apoptose dieser Zellen liegen, in denen die Aktivierung der Caspase 3 bereits abgeschaltet ist, oder an der für Antikörper relativ schlechten Permeabilität der Retina in Vibratomschnitten.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Induktion von Apoptose im Nervensystem im Alter von ca. 36 hpf für die Degeneration der Zellen verantwortlich ist. Dies könnte auch die Ursache für den "kleine-Augen"-Phänotyp der mutanten Embryonen sein.

3.3.7 In *cb1*-Embryonen lässt sich Apoptose zwischen 28 hpf und 3 dpf im zentralen Nervensystem nachweisen

Um den Zeitverlauf der Apoptose in *cb1*-Embryonen zu bestimmen, wurden lebende Embryonen verschiedener Stadien mit Acridine Orange gefärbt (Abb. 21). Zuerst werden einzelne apoptotische Zellen in einem Alter von ca. 28 hpf im Mesencephalon/Mittelhirn (Abb. 21A, Pfeil) und im Metencephalon (Abb. 21A, Pfeilspitze) sichtbar. Ebenso finden sich erste apoptotische Zellen im Auge. Eine starke Färbung, sowohl in wildtypischen als auch in mutanten Embryonen findet sich in der Nasenplakode, was teilweise zu Überstrahlung in diesem Bereich führt (Abb. 21A, Asterisk). Dies bleibt auch in späteren Stadien erhalten (Abb. 21D und F). In den Neuromasten des Seitenlinienorgans ist auch sowohl in der Mutante als auch im Wildtyp eine Färbung vorhanden (Abb. 21L und M, Pfeilspitzen).

Nach 36h haben *cb1*-mutante Embryonen (Abb. 21C) im Gegensatz zu wildtypischen Embryonen (Abb. 21B) starke Apoptose in vielen neuronalen Strukturen. Vor allem Diencephalon (d), Mesencephalon (m), Metencephalon (Cerebellum, c), Myelencephalon (Rhombomere, r) und Auge (a).

Im Alter von 48 hpf haben mutante Embryonen Apoptose in fast allen Bereichen des Zentralnervensystems (Abb. 21F und G). Betroffen ist jetzt auch das Rückenmark, das gesamte Gehirn (Abb. 21F, Pfeil bzw. Pfeilspitze), und, wie in der Ansicht von dorsal zu sehen, das Tectum, aber nicht der ventrikuläre Bereich (Abb. 21G, Pfeilspitze bzw. Pfeil).

Nach 3 Tagen ist die Apoptose deutlich zurückgegangen, es sind noch einige apoptotische Zellen in den Geweben des Zentralnervensystems und im Auge vor allem in der CMZ vorhanden (Abb. 21J, K und M).

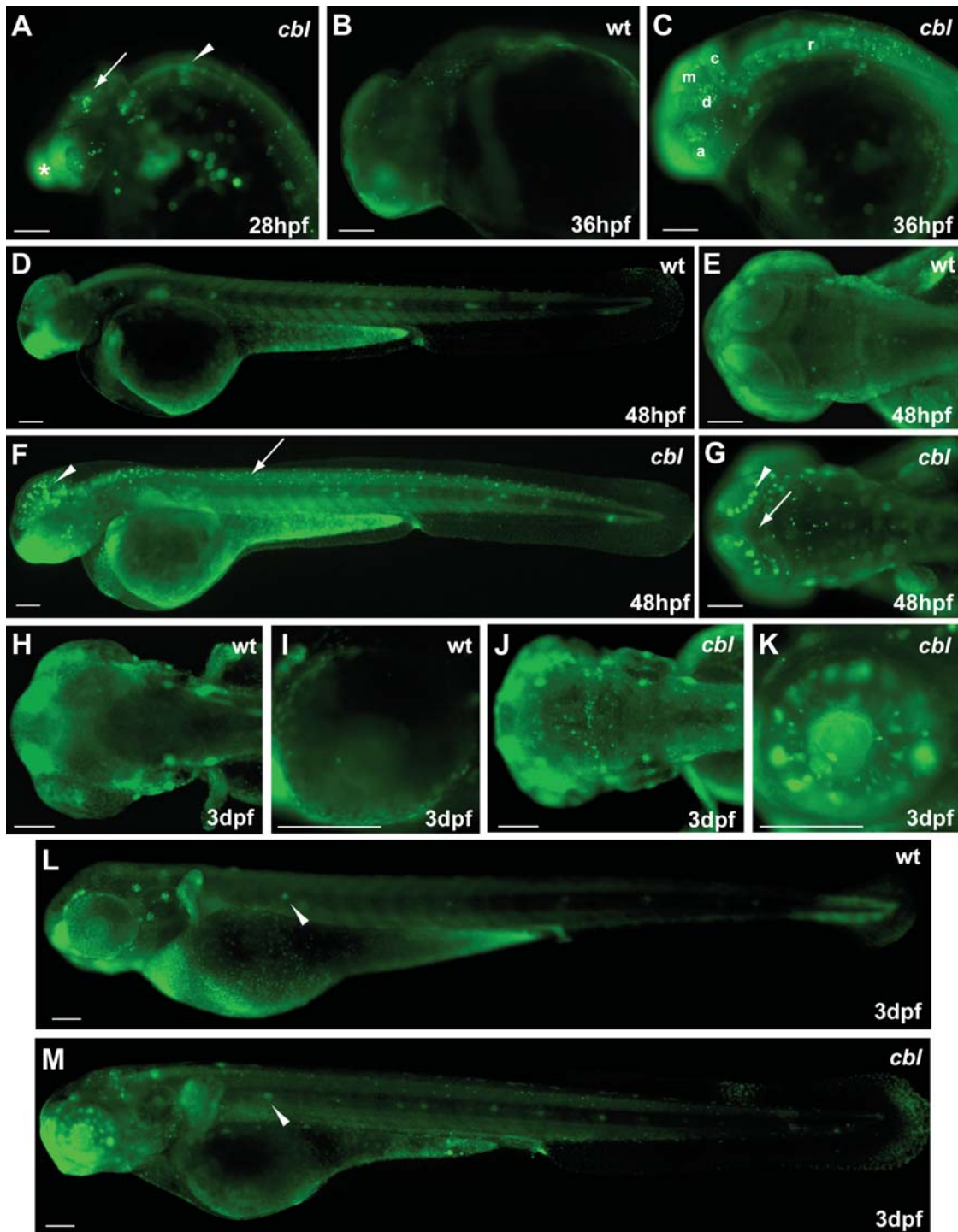


Abb. 21: Acridine Orange-Färbungen an lebenden Embryonen verschiedenen Alters zeigen Apoptose im zentralen Nervensystem von *cbl*-Mutanten. **A:** *cbl*-Embryonen im Alter von 28 hpf. Die Apoptose in der Nasenplakode (Asterisk) tritt in diesem und späteren Stadien auch in Wildtypen auf. **B, C:** Embryonen im Alter von 36 hpf. **D-G:** Embryonen im Alter von 48 hpf **H-M:** Embryonen im Alter von 3 dpf. a Auge, c Cerebellum, d Diencephalon, m Mesencephalon, r Rhombomere des Myelenzephalon.

Erläuterungen im Text. A-D, F, I, K-M: Seitenansicht, dorsal oben, anterior links. E, G, H, J: Ansicht von dorsal, anterior links. Größenbalken 100 µm.

3.3.8 Der zeitliche Verlauf der Apoptose im Auge korreliert mit dem Muster der Zellproliferation

Die Neurogenese in der Retina beginnt im ventronasalen Bereich und setzt sich nach dorsonasal, dorso-temporal und zuletzt ventro-temporal fort, wie beim Aufklappen eines Fächers (Hu und Easter, 1999). Die ersten Zellen, die postmitotisch werden, sind die Ganglienzellen im ventronasalen Bereich. Die Neurogenese der inneren und der äußeren Kernschicht beginnt ebenfalls in diesem Bereich. Zellzyklus-Marker wie *ath5*, die in Zellen exprimiert werden, die den Zellzyklus verlassen, zeigen ebenfalls dieses Muster (Masai et al., 2000)

Die Neurogenese verläuft außerdem von proximal nach distal, d. h. sie ist im proximalen Bereich am weitesten fortgeschritten.

Vergleicht man den Zeitverlauf der Apoptose in den Augen von *cb1*-Mutanten mit diesem Muster der Zellteilungen, lässt sich eine Übereinstimmung erkennen (Abb. 22 A bis D).

Im distalen Bereich der Retina in einem Auge im Alter von 42 hpf finden sich apoptotische Zellen lediglich ventronasal (Abb. 22A, Pfeilspitze). Bei optischen Schnitten, die weiter proximal liegen, sind apoptotische Zellen zuerst weiter dorsonasal vorhanden (Abb. 22B), weiter proximal dann auch dorso-temporal (Abb. 22C) und zuletzt auch ventro-temporal (Abb. 22D).

Die Apoptose folgt also der Welle der letzten Mitose in der neuronalen Retina. Sie findet in Zellen statt, die sich am Punkt des Verlassens des Zellzyklus befinden.

Die Induktion der Apoptose findet demzufolge in Zellen statt, die sich an einem bestimmten Punkt dieses Ablaufs von Differenzierung und Zellteilung befinden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass sich einige Zellen der verschiedenen Zelltypen differenzieren, auch wenn z. B. die Photorezeptoren nicht gestaut und missgebildet erscheinen (Abb. 19C und D). Ebenso ist zu erkennen, dass die Schichtung der Retina zum Teil ausgebildet wird und auch die plexiformen Schichten (Axone) gebildet werden.

Es konnte keine Verzögerung der Entwicklung der Retina in der *cb1*-Mutante festgestellt werden, wie sie in anderen Mutanten ähnlichen Phänotyps beschrieben wurde (z. B. Baye und Link, 2007).

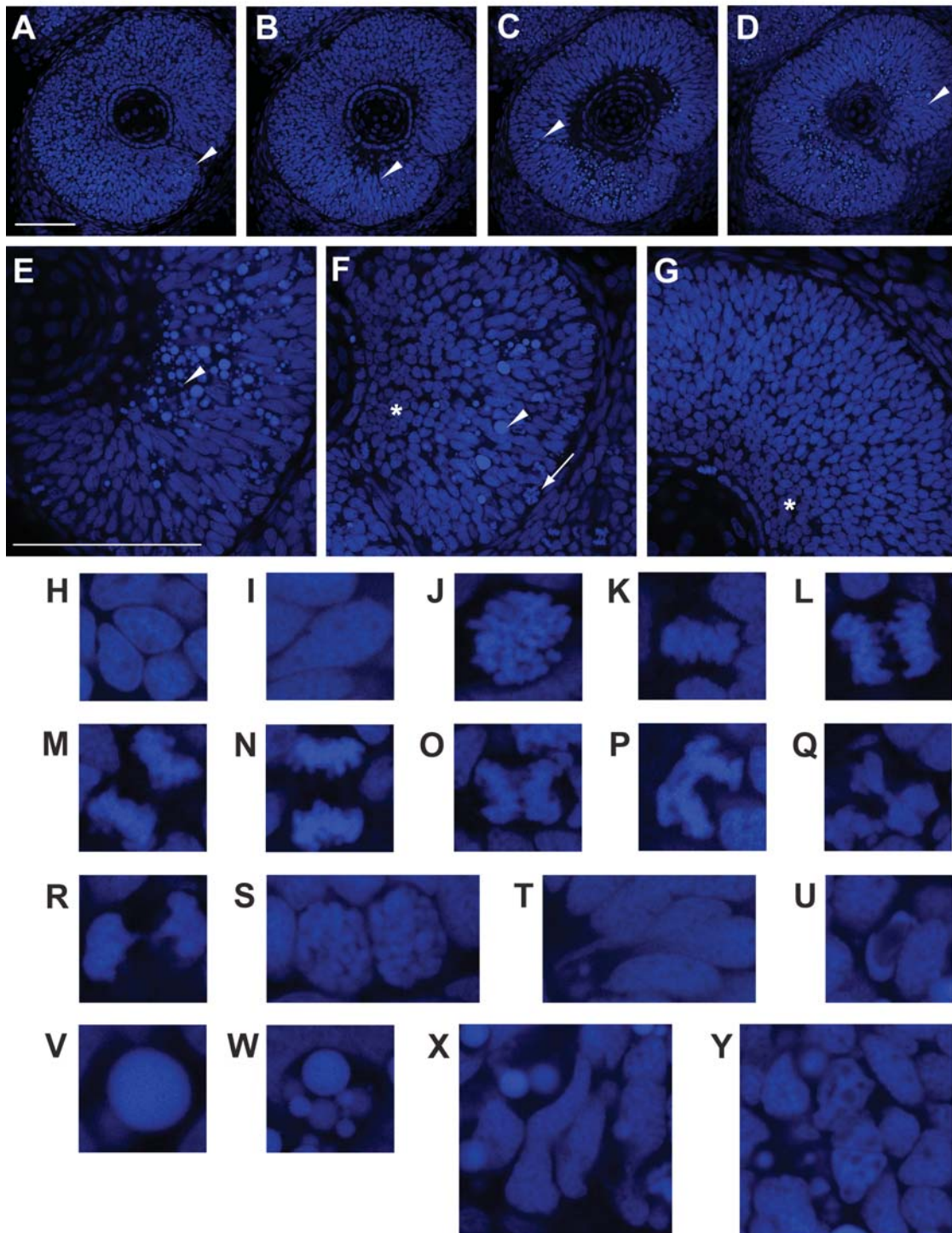


Abb. 22: Analyse der Morphologie der Zellkerne in der neuronalen Retina bei 42 hpf. **A-D:** Lokalisation der Apoptose innerhalb eines Auges. Schnittebenen von distal (A) über mittig (C) nach proximal (D). **E-G:** Lokalisation von Zellen verschiedener Stadien in mutanten (E und F) und wt-Retinae (G). **H-Y:** Morphologie der Zellkerne in *cbl*-

Mutanten Retinae. H und I: Zellen in der Interphase, J und K: Metaphase, L-Q: Anaphase, R und S: Telophase, U-W: Apoptotische Zellen, T, X, Y: Zellen mit ungewöhnlicher Morphologie. A-D: Lateralschnitte, anterior unten rechts, ventral oben rechts. E-G: Lateralschnitte, anterior rechts. H-Y: Lateralschnitte, vergrößerte Ausschnitte, temporaler Bereich. Größenbalken 100 μm .

Um hier genauere Aussagen treffen zu können, wären Beobachtungen an lebenden Embryonen, wie z. B. Zeitraffer-Aufnahmen, notwendig. So könnte z. B. gezeigt werden, ob Zellen vor, während oder nach der Zellteilung die Apoptose einleiten.

3.3.9 Morphologie mitotischer Zellkerne in *cb1*-mutanten Retinae

Um zu untersuchen, welche Vorgänge zur Aktivierung der Apoptose in retinalen Zellen führen, wurden Färbungen mit DAPI an Retina-Schnitten von 42 h alten Embryonen durchgeführt. Mit DAPI lässt sich DNA spezifisch färben und ermöglicht so die Beobachtung morphologischer Veränderungen des Chromatins der Zellkerne.

Wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, korreliert der Beginn der Apoptose in der Retina von *cb1*-Embryonen mit der Neurogenese. In Abb. 22E sind in Übereinklang damit apoptotische Zellen im ventronasalen Bereich zu sehen, wo die ersten postmitotischen Ganglienzellen erwartet werden (Pfeilspitze).

Mitotische Zellkerne finden sich im apikalen Bereich der neuronalen Retina (Abb. 22F, Pfeil), da interkinetische Migration stattfindet. Bis zu einem Alter von ca. 3 dpf finden die Zellteilungen im apikalen Bereich der Retina statt, danach werden postmitotische Zellen nur noch von der CMZ aus an die neuronale Retina abgegeben. Apoptotische Zellkerne sind selten im apikalen Bereich lokalisiert, sondern eher im mittleren bis basalen, und zwar je weiter basal, desto fragmentierter erscheinen die Zellkerne. Im mittleren Bereich sind sie relativ unfragmentiert (Abb. 22F, Pfeilspitze), während sie im basalen Bereich schon weiter im Verlauf der Apoptose fortgeschritten sind (Abb. 22E). Die Zellen scheinen während der interkinetischen Migration von apikal nach basal die Apoptose einzuleiten, die dann mit ihrer Wanderung nach basal weiter fortschreitet.

In wildtypischen Retinae dieses Stadiums sind keine apoptotischen Zellen vorhanden (Abb. 22G). Normale Ganglienzellen sind sowohl in *cb1*- als auch in wt-Retinae im basalen Teil der Retina lokalisiert (Abb. 22F und G, Asterisk).

Bei den Zellkernen in *cbl*-Retinae fällt auf, dass postmitotische Ganglienzellen (Abb. 22H) und andere Zellen in der Interphase (Abb. 22I) oft normal erscheinen, ebenso wie Zellkerne in der Metaphase (Abb. 22J und K, Aufsicht bzw. Seitenansicht der Metaphase-Platte bei *cbl*-Mutanten).

Die Chromosomen in der Metaphase erscheinen normal kondensiert und ordnen sich in der Metaphase-Platte an (Abb. 22J und K).

Zellkerne in der frühen Anaphase weisen auch noch keine Defekte auf (Abb. 22L), dagegen sind Zellkerne in der späteren Anaphase entweder normal (Abb. 22M und N) oder weisen Chromatin-Brücken auf (Abb. 22O und P), die bei wildtypischen Retinae wesentlich seltener auftreten. In der Telophase finden sich Zellkerne mit (Abb. 22Q und R) und ohne Chromatin-Brücken (Abb. 22S).

Neben den Zellkernen, die Phasen des Zellzyklus zuzuordnen sind, sind eindeutig apoptotische Zellen (Abb. 22U bis W), sowie Zellkerne, die langgezogen (Abb. 22T), verformt oder ungewöhnlich erscheinen (Abb. 22X und Y) vorhanden.

3.3.10 Chromatin-Brücken in mitotischen Zellen von *cbl*-Retinae

Defekte Komponenten des Condensin-Komplexes führen oft zu Chromatin-Brücken in der Anaphase (z. B. Dej et al., 2004).

Um zu untersuchen, ob Chromatin-Brücken auch in der *cbl*-Mutante zu beobachten sind, wurden vergleichbare DAPI-gefärbte Retina-Schnitte (40 hpf) analysiert (Beispiele für Ausschnitte in Abb. 23A und B). Gezählt wurden alle Zellkerne in der späten Metaphase und in der Anaphase. Als Zellkerne mit Chromatinbrücken galten alle Zellkerne, in denen die Chromosomen noch nicht komplett auseinander gewichen sind.

Die absoluten Zahlen der Zellkerne mit und ohne Chromatinbrücken in der späten Metaphase und Anaphase sind in Abb. 23C dargestellt; die Anteile von Zellen mit und ohne Chromatinbrücken in Prozent bei wt- und *cbl*-Retinae sind in Abb. 23D dargestellt. Während in wt-Retinae 23 % der Zellen in der späten Meta- und Anaphase Chromatinbrücken aufweisen, sind dies in *cbl*-Retinae mit 53 % mehr als doppelt so viele.

Daher lässt sich eine erhöhte Rate an Zellen mit Chromatin-Brücken in *cbl*-Retinae feststellen.

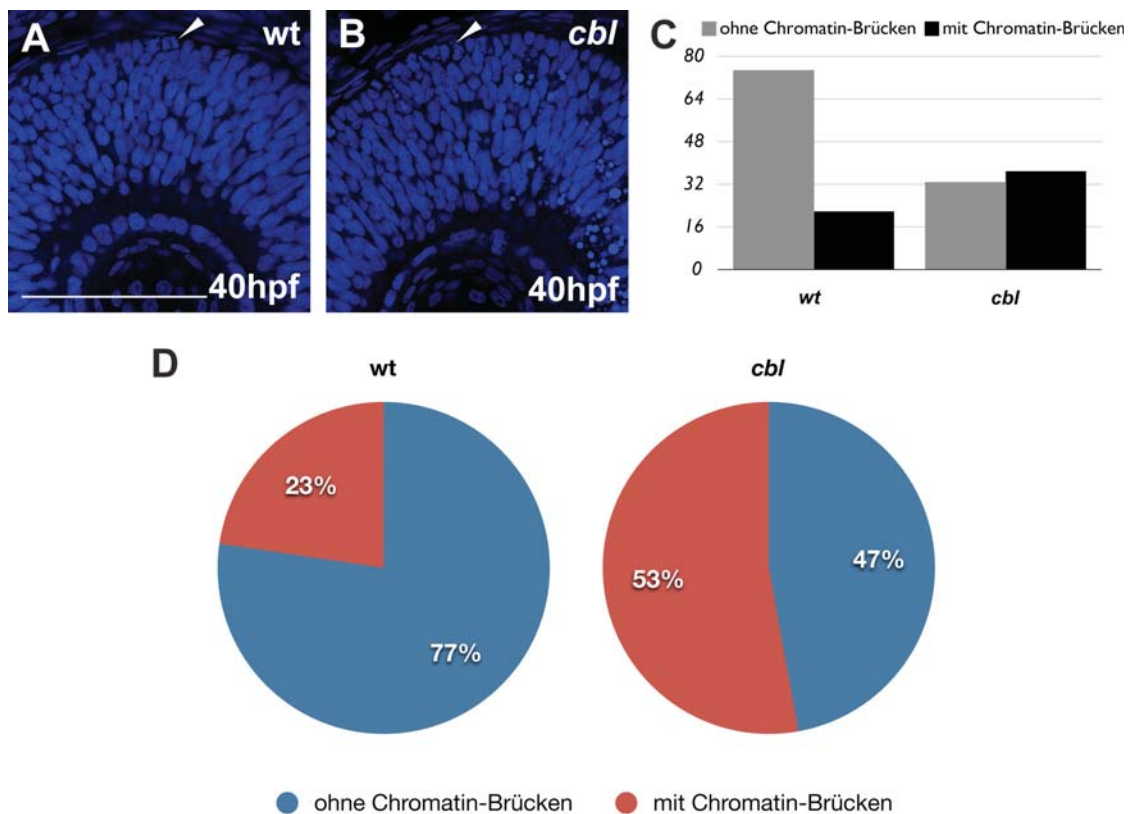


Abb. 23: Untersuchung von Retinae auf Chromatin-Brücken in der Anaphase im Alter von 40 hpf. A und B: Beispiele für optische Schnitte von wt- (A) und *cbl*-Retinae (B), die ausgezählt wurden. Die Pfeilspitzen deuten auf Zellen in der Anaphase. C und D: Auswertung der Zählungen. Erläuterungen im Text. Größenbalken 100 µm.

3.3.11 Die Zellkerne der *cbl*-mutanten Retina sind vergrößert

Für eine weitere Analyse der Vorgänge in den Zellen vor der Aktivierung der Apoptose wurden die Zellkerne in Retinae im Alter von 42 hpf vermessen. Dazu wurden Einzel-Bilder aus Confocal-Scans vergleichbarer Augen-Abschnitte (Größe der Linse, gleicher Winkel, gleicher Augen-Ausschnitt, gleiche Mikroskop-Einstellungen), gefärbt mit DAPI, ausgewählt (Abb. 24A und B).

Es wurden jeweils 4 Bilder von Wildtypen bzw. *cbl*-Mutanten zunächst mit Adobe Photoshop vorbereitet und dann mit ImageJ vermessen. Die Bilder wurden in Photoshop im RGB-Modus mit einer Einstellungs-(Adjustment-)Ebene versehen und im Histogramm wurde der Tonwert auf einen Bereich von ca. 5-200 eingestellt. Mit dem Filter "Smart Sharpen" wurde die Linsen-Unschärfe ("Lens Blur", Radius 2,0 Pixel,

Amount ca. 200 %) etwas abgeschwächt und die Konturen etwas verstärkt (“Sharpen Edges”) um die Umrisse der Zellkerne deutlicher hervorzuheben. Mit einer weiteren Ebene wurden alle nicht zur neuronalen Retina gehörenden Zellkerne (Linse, RPE) abgedeckt. In ImageJ wurden dann die so vorbereiteten Bilder zunächst in 16-bit (Graustufen) umgewandelt und mit der Funktion “Subtract Background” (Rolling Ball Radius 70) der Hintergrund verdunkelt. Nachdem weichgezeichnet wurde, wurde nochmals der Hintergrund (Rolling Ball Radius 50) verdunkelt. Anschließend wurde der Schwellenwert für die Binärkodierung verändert (“Adjust Threshold”), bis eine zufrieden stellende Abdeckung der Zellkerne erreicht war. Diese binär kodierten Bilder mussten noch per Hand nachbearbeitet werden, da allein mit der Software keine ausreichende Trennung der Zellkerne erreicht werden konnte. Zuletzt wurde mit “Analyze Particles” in ImageJ die Größe der Zellkerne vermessen und ein Bild der Umrisse sowie eine Tabelle der gemessenen Werte erzeugt. Die Ausgabe der gemessenen Größe erfolgt in Pixeln. Um nur wirkliche Zellkerne zu messen, wurden alle Partikel unter einer Größe von 500 Pixeln ausgeschlossen; dies hat auch zur Folge, dass stark fragmentierte Zellkerne in mutanten Augen nicht mehr mitgezählt werden.

Die Zellkerne der *cb1*-mutanten Augen sind deutlich größer und es sind weniger Zellkerne vorhanden (Abb. 24C und D). In der statistischen Auswertung der Messungen lässt sich dies belegen (Abb. 24G und H). Im statistischen Mittel sind in Mutanten weniger Zellen vorhanden als in Wildtypen. Ebenso ist die Größe der Zellen im statistischen Mittel messbar größer.

Trägt man die Anzahl der Zellkerne, die einer Größenkategorie (in Pixeln, 100er-Schritte) angehören, in ein Diagramm ein, wird deutlich, dass in wildtypischen Augen mehr Zellkerne der kleinen Kategorien auftreten als in mutanten (Abb. 24I). Die Zellkerne der größeren Kategorien sind in mutanten Augen häufiger, dies wird besonders in der prozentualen Darstellung deutlich (Abb. 24J und K). Zellkerne der Größenkategorie ab 2000 Pixel treten in wildtypischen Augen kaum auf, in den mutanten Augen sind diese jedoch vorhanden. Zusammengefasst sind 2,4 % (bei den Wildtypen) bzw. 8,6 % (bei den Mutanten) aller Zellkerne über 2000 Pixel groß (Abb. 24K).

Es ist anhand der Abbildungen nicht eindeutig zu klären, ob die größeren Zellkerne zu Zellen gehören, die sich noch nicht geteilt haben und folglich deren Eintritt in die Mitose verzögert ist, oder ob diese Zellkerne nach einer unvollständigen Teilung wieder dekondensieren, ohne dass die Zellteilung abgeschlossen wird. Die Frage ist nun, ob die Apoptose der Zellen vor der Mitose oder danach, bzw. währenddessen eingeleitet wird.

Um Anhaltspunkte hierfür zu bekommen, wurde ein Augenschnitt eines Wildtypen im Alter von 40 hpf ausgewertet. Dazu wurde exakt wie mit den anderen Augenschnitten verfahren. In Wildtypen bei 40 hpf sind mehr große und weniger kleine Zellen als bei 42 hpf vorhanden (Abb. 24L). Die Verteilung der Zellgröße bei *cb1*-Mutanten Augen (42 hpf) zeigt, dass zwar mehr große Zellen als bei Wildtypen im gleichen Alter vorhanden sind, aber es finden sich deutlich mehr kleine Zellen, als bei Wildtypen im Alter von 40 hpf.

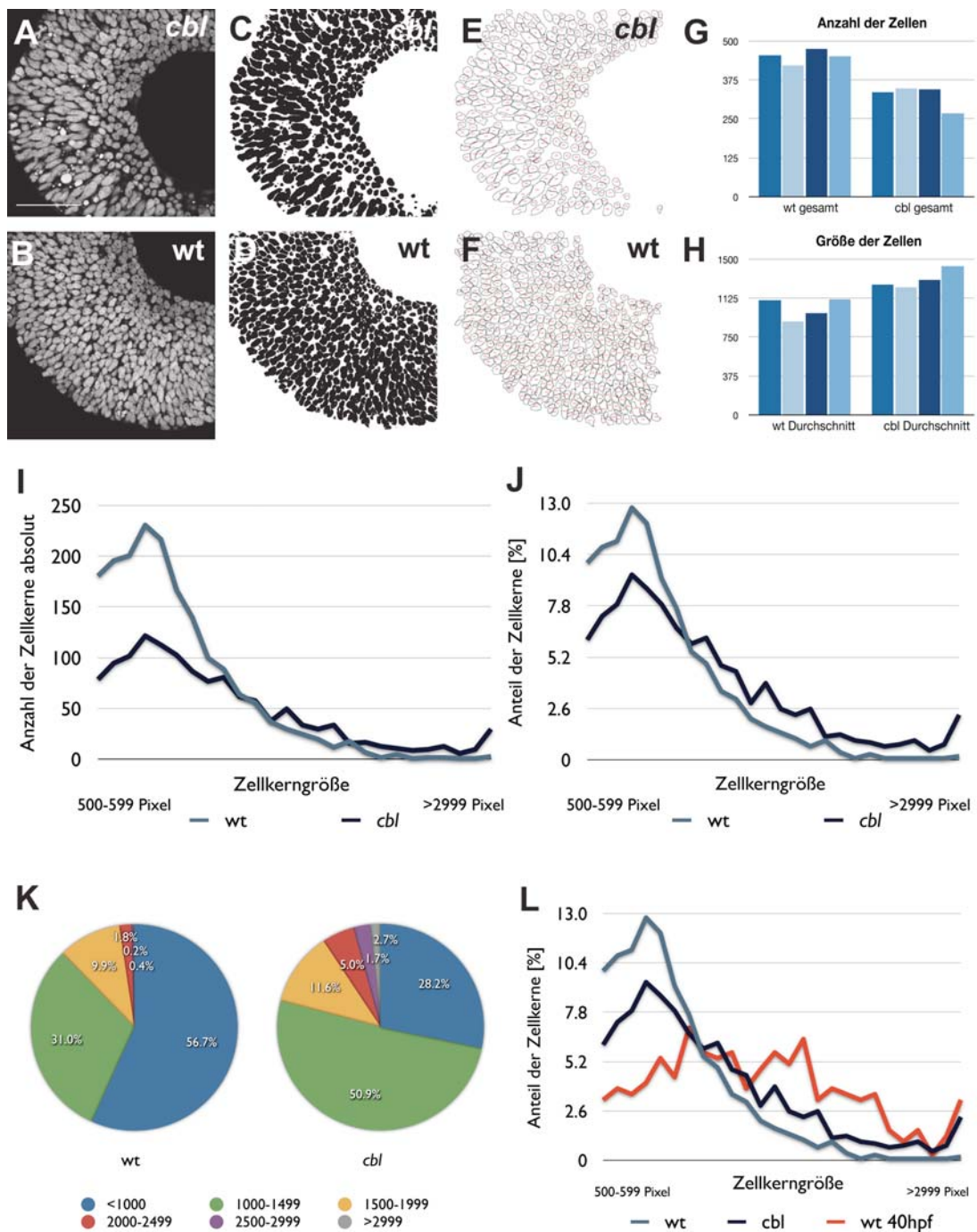


Abb. 24: Messung der Zellkerngröße in wt- und *cbl*-Retina-Schnitten bei 42 hpf. A-F: Prozessierung der optischen Schnitte für die Messung der Zellkerne mit ImageJ. G-L: Grafische Darstellung der Messergebnisse. G: Gesamtzahl der Zellkerne in allen gezählten Retina-Schnitten, H: Durchschnittliche Größe der Zellkerne in Pixeln in allen gemessenen Retina-Schnitten, I: Größenverteilung der Zellkerne absolut, J: Größenverteilung der Zellkerne in Prozent, K: Verteilung der Größe der Zellkerne bei wt (links) und *cbl* (rechts), L: Größenverteilung der Zellkerne bei 42 hpf (blau) verglichen mit der eines wt-Retina-Schnittes bei 40 hpf (rot). Größenbalken in Bildern 100 µm. Alle Größenangaben der Messungen in Pixeln.

Das Muster der Größenverteilung der Zellkerne in 42-hpf-*cbl*-Retinae liegt also zwischen den Mustern der wt-Retinae im Alter von 40 und 42 hpf. Dies könnte auf eine Verzögerung der Zellteilung in der *cbl*-Retina hinweisen, da weniger kleine Ganglienzellen vorhanden sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die *cbl*-Retina (42 hpf) mehr größere und weniger kleine Zellkerne aufweist, als die wt-Retina. Dies spricht entweder für einen Zellzyklusarrest vor der Teilung der (großen) Zellen mit dupliziertem Genom, oder für eine hohe Apoptoserate und somit Elimination der postmitotischen (kleinen) Zellen in der *cbl*-Retina, oder für unvollständige Mitosen mit Abbruch der Zellteilung, so dass aneuploide Zellen akkumulieren.

3.3.12 Im Knorpelgewebe treten in *cbl*-Mutanten größere Zellen auf

Auf Grund der Vermutung, dass Zellteilungen in *cbl*-Embryonen zum Teil nicht beendet werden, wurden Färbungen mit Alcian Blue, das spezifisch Chondrozyten färbt, durchgeführt (Abb. 25). In 5dpf-*cbl*-Embryonen sind Mandibular-, Hyoid- und Kiemenbögen ausgebildet (Abb. 25B). Allerdings sind einige Chondrozyten im Vergleich zum Wildtyp vergrößert (Abb. 25D, Pfeil).

Ähnliche Defekte wurden in Embryonen, in denen *ubc9* ausgeschaltet wurde, beobachtet (Nowak und Hammerschmidt, 2006). Durch Knockdown von *ubc9* treten Defekte in der Teilung von Chondrozyten und eine Akkumulation von aneuploiden Zellen auf.

Für die *cbl*-Mutante könnte dieses Ergebnis einen Defekt auch in nicht neuronalen Zellen bedeuten.

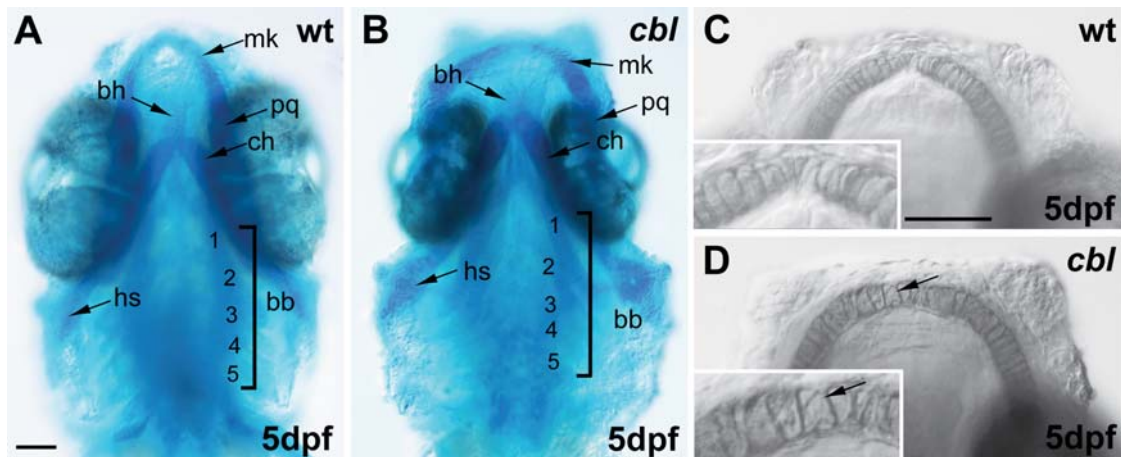


Abb. 25: Chondrozyten in *cbl*-Mutanten sind vergrößert. Alcian Blue Färbung an wt- (A und C) und *cbl*-Embryonen (B und D) an Tag 5. C, D: Vergrößerungen von anterioren Bereichen (Mandibularbögen). bb Branchialbögen, bh Basihyale, ch Ceratohyale, hs "Hyosymplectic", mk Meckelscher Knorpel (Mandibulare), pq Palatoquadratum (mk und pq: Mandibularbogen, bb, bh, ch: Hyoid-(Zungenbein-)Bogen. Ventralansichten, anterior oben. Größenbalken 100 µm.

3.3.13 Zellzyklus und Proliferation in *cb1*-Mutanten weisen keine Defekte auf und die S-Phase ist nicht verlängert

Auf Grund der Vermutung, dass Zellen wegen Fehlern in der Mitose die Apoptose einleiten, wurde der mitotische Index von wildtypischen und mutanten Retinaschnitten berechnet und verglichen. Es besteht die Möglichkeit, dass die Zellen vor der Mitose absterben, was z. B. einen Defekt der Chromosomen-Kondensation bedeuten könnte, oder die Zellen arretieren in der Mitose, ähnlich *cdc2*- und *cdk*-Mutanten, in denen mitotische Checkpoints nicht überschritten werden können.

Der mitotische Index gibt das Verhältnis von Zellen in der Mitose zu Zellen in der Interphase an. Um den mitotischen Index zu berechnen, wurden DAPI-gefärbte 40 hpf-Retinae in konfokalen Schnittebenen aufgezeichnet. Davon wurden für die Auszählung der 40 h alten Retinae 7 Schnitte von jeweils einem mutanten und einem wildtypischen Auge ausgewählt, die um den größten Linsendurchmesser herum lagen und definierte Abstände voneinander hatten. Für die Auszählung der 42 h alten Retinae wurden von jeweils 2 Augen 4 Schnitte ausgewählt. Gezählt wurde die Anzahl der Zellkerne, die als Zahl der Zellen interpretiert werden kann.

Die Anzahl der Zellen, die sich in verschiedenen Stadien des Zellzyklus befinden, wurden anschließend mit Hilfe des Cell-Counter-Plugins (<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/cell-counter.html>) von ImageJ gezählt. Dazu wurden die Bilder mit Photoshop so aufbereitet, dass die Struktur der DNA in den Zellkernen deutlich zu sehen war, um sie den verschiedenen Phasen des Zellzyklus zuordnen zu können (Abb. 26A und B). Das Cell-Counter-Plugin hilft, bis zu 8 verschiedene Kategorien, denen Zahlen und/oder Ziffern zugeordnet werden können, zu zählen (Abb. 26C).

Typ 2 (türkis) wurde den Zellen der Interphase zugeordnet, Typ 3 (grün) Zellen in Mitose, Typ 4 wurde pyknotischen Zellen zugeordnet und Typ 5 (gelb) nicht definierbaren Zellen.

Kondensierte Chromosomen wurden als mitotisch gezählt, während nicht kondensierte aber strukturierte DNA enthielten, als Interphase gezählt. Zellen, Unstrukturierte, stark gefärbte DNA wurden als pyknotisch ausgewertet. Der Rest, der keiner dieser Kategorien zuzuordnen war, wurde als nicht determinierbar (N.D.) gezählt.

Die durchschnittliche Anzahl der Zellkerne in konfokalen Schnittebenen bei 40 hpf ist in Abb. 26D dargestellt. Obwohl die Gesamtzahl der Zellen in *cb1*-Mutanten stark verringert ist, ist der mitotische Index gleich dem wildtypischen. Die Zahl der Zellen in der Interphase in mutanten Augen ist deutlich geringer als in wildtypischen Augen. Zellen in Mitose sind in *cb1*-Augen etwas seltener als in wildtypischen, da aber die Gesamtzahl der Zellen ebenso reduziert ist, ist deren Anteil wie bei Wildtypen ca. 3 % (Abb. 26E). Dieser Unterschied ist mit einem angenommen Signifikanzniveau von $\alpha=1$ % nach Gleichung 1 signifikant.

Gleichung 1: Chi-Quadrat-Test, vereinfachte Gleichung für eine Matrix mit einem Freiheitsgrad

$$\begin{array}{ccc} a & b & S_1 \\ c & d & S_2 \\ S_3 & S_4 & N \end{array}, \frac{N(ad-bc)^2}{S_1 S_2 S_3 S_4} \geq \chi^2, (1-\alpha; df=1)$$

Bei 42 hpf sind die Zahlenverhältnisse ähnlich. Während bei wt-Augen der Anteil der Zellen in Interphase 97 % beträgt, ist er in mutanten Augen nur bei 75 %. Die Zahl der mitotischen Zellen in wt-Retinae beträgt 2 % und in mutanten Retinae 3 %. Dieser Unterschied ist aber, betrachtet man das Verhältnis der mitotischen zu Interphase-Zellen, nach Gleichung 1 und einem angenommenen Signifikanzniveau von $\alpha=1$ % nicht signifikant (Köhler et al., 1992).

Auf Grund der Beobachtung, dass viele Zellen, die keinem bestimmten Stadium zugeordnet werden konnten, sich in der Proliferationszone befinden (Abb. 26B, gelbe Markierungen/Typ 5), kann vermutet werden, dass die Zellen zu diesem Zeitpunkt mitotische Defekte aufweisen und anschließend die Apoptose eingeleitet wird.

Die Tatsache, dass die apoptotischen, bzw. nicht zu einem Stadium zugeordneten Zellen sich nicht ausschließlich in der Proliferationszone befinden, könnte ein Resultat der trotz Defekten eingeleiteten Migration der Zellen zu ihrem ursprünglichen Bestimmungsort sein.

Der mitotische Index ist in *cbl*-mutanten Retinae gleich dem in wt-Retinae und es tritt kein Zellzyklusarrest auf.

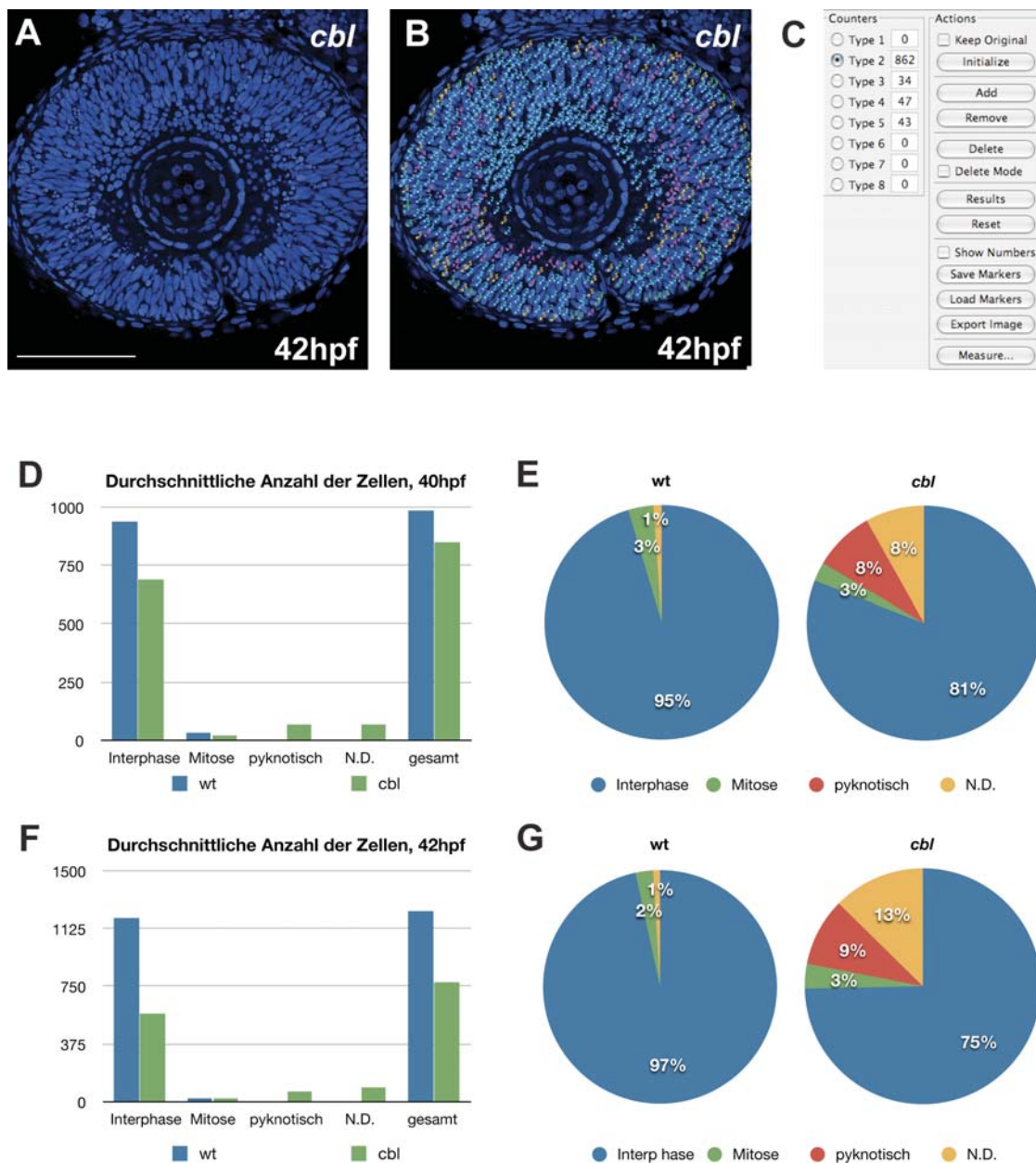


Abb. 26: Mitotischer Index. A: Lateralschnitt einer *cbl*-Retina, vorbereitet zum Auszählen der Zellkerne in den verschiedenen Phasen mit ImageJ. B: Dieselbe Retina, Zellkerne mit ImageJ markiert und gezählt. C: Fenster in ImageJ, mit Auszählung der Zellkerne einer Retina. D-G: Auswertung der Zählungen für Retinae im Alter von 40 und 42 hpf. Erläuterungen im Text. Größenbalken 100 μ m.

3.3.14 In *cbl*-Retinae treten mitotische Zellen in die Apoptose ein, ohne den Zellzyklus anzuhalten

Um die Vermutung zu überprüfen, dass kein mitotischer Arrest stattfindet, bevor die Zellen in die Apoptose eintreten, wurden Färbungen mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes Histon H3 (PH3) gemacht. Der PH3-Antikörper färbt spezifisch Zellen, die sich in der späten G₂ oder M-Phase des Zellzyklus befinden.

Diese wurden ausgezählt bei 24 und 48 hpf in vergleichbaren transversalen optischen Schnitten (Abb. 27A, B, D und H). Ausgezählt wurden jeweils drei Schnitte. In beiden Fällen sind in *cbl*-Retinae weniger PH3-positive Zellen zu finden (Abb. 27C). Im 24 hpf-Stadium weisen die Zellen der mutanten Retinae durchschnittlich 9 PH3-positive Zellen auf und die der wildtypischen 12. Im Alter von 48 hpf sind in der mutanten Retina 22 und im Wildtyp 25 PH3-positive Zellen vorhanden. Da die Retinae der *cbl*-Embryonen in diesem frühen Stadium noch nicht wesentlich weniger Zellen besitzen als die der Wildtypen, sind diese absoluten Zahlen vergleichbar. Somit weisen die *cbl*-Retinae keinen Zellzyklusarrest in der M-Phase auf.

Die Doppelfärbung von PH3 und TUNEL zeigt, dass Zellen in der Retina von *cbl*-Mutanten während der Mitose die Apoptose einleiten. In Schnitten von *cbl*-Retinae lassen sich Zellen, die nur PH3- (Abb. 27F, Pfeil), nur TUNEL- (Abb. 27F, kurzer Pfeil) oder beide Färbungen (Abb. 27F, Pfeilspitzen) zeigen. In wt-Retinae sind keine TUNEL-positiven Zellen vorhanden (Abb. 27H und I).

Um die Replikationsrate zu bestimmen, wurde eine BrdU-Injektion in 34 hpf alte Embryonen durchgeführt und diese nach zwei Stunden Inkubation fixiert. Die Embryonen wurden geschnitten und eine Färbung für BrdU durchgeführt (Abb. 27J und K). So konnte untersucht werden, ob eventuell ein Arrest des Zellzyklus bereits in der S-Phase auftritt und auf Grund verzögerter Replikation weniger BrdU in Zellen aufgenommen wird. Bei *cbl*-Embryonen ist ein Einbau von BrdU zu verzeichnen, der ungefähr dem in wt-Embryonen entspricht. Es findet demzufolge Replikation statt und ein Arrest in der S-Phase scheint nicht aufzutreten.

Somit leiten mitotische Zellen in *cbl*-Retinae während der Mitose Apoptose ein, ohne dass dem ein Arrest des Zellzyklus in der S- oder M-Phase vorausgeht.

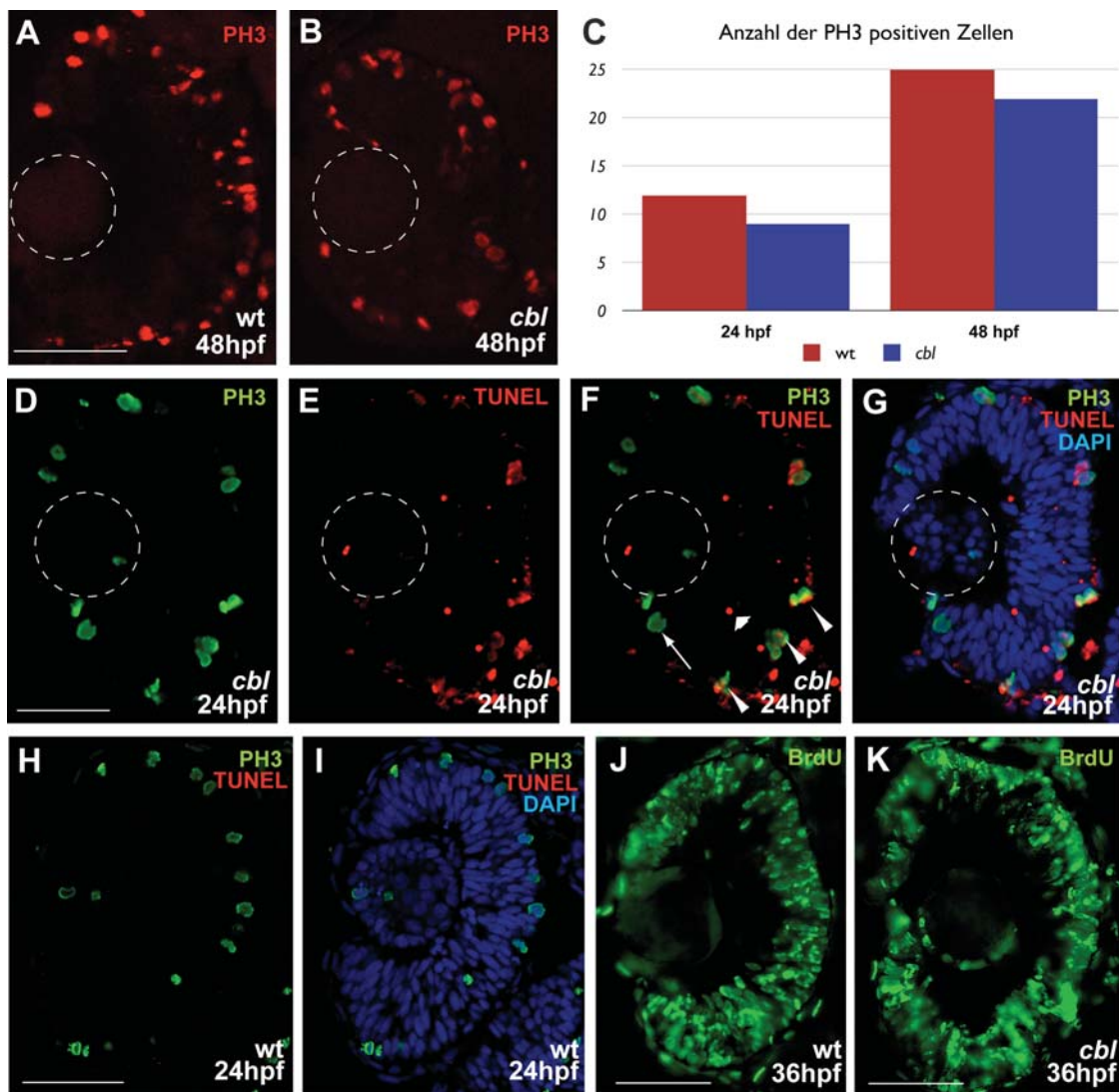


Abb. 27: In *cbl*-mutanten Retinae treten mitotische Zellen in die Apoptose ein, ohne den Zellzyklus anzuhalten. **A und B:** Expression von PH3 in wt (A) und *cbl* (B) bei 48 hpf. **C:** Grafische Darstellung der durchschnittlichen Anzahl PH3-positiver Zellen pro Retina-Schnitt. **D bis I:** Färbung von PH3 (grün), TUNEL (rot) und DAPI (blau) in einer *cbl*-Retina (D bis G) und einer wt-Retina (H und I) bei 24 hpf. **J und K:** BrdU-Färbung bei 36 hpf nach einer zweistündigen Inkubation bei wt (J) und *cbl* (K). Erläuterungen im Text. gestrichelte Linie: Lage der Linse. Transversalschnitte, dorsal oben. Größenbalken 100 µm.

4 Diskussion

4.1 Die Funktion von zCAP-G

4.1.1 zCAP-G und mitotische Chromosomen-Struktur

Ich konnte hier zeigen, dass das *cap-g*-Gen in der Zebrafisch-Mutante *creature from the black lagoon* (*cbl*) mutiert ist. Die Mutante zeichnet sich durch kleine Augen aus, die ab ca. 3 dpf zu erkennen sind, während andere Organe normal erscheinen. Die Zahl der Zellen der neuronalen Retina ist stark reduziert und wird durch eine hohe Apoptose-Rate der neuronalen Zellen ab 24 hpf bedingt. Auch weitere Gewebe des zentralen Nervensystems weisen eine erhöhte Apoptose-Rate auf. Die Expression von *zcap-g* ist ebenso auf das zentrale Nervensystem beschränkt. In den Zellteilungen der Retina treten vermehrt Chromatin-Brücken während der Anaphase auf und viele Zellkerne sind deformiert. Während die Zahl der Zellen in der neuronalen Retina reduziert ist, ist die Zellteilungsrate normal und es tritt kein Zellzyklusarrest auf. Die zeitliche Änderung der Apoptose-Rate korreliert mit dem Zellzyklus der neuronalen Zellen der Retina und scheint während der Mitose eingeleitet zu werden.

Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen, dass Condensin I in neuronalen Geweben zu Chromatin-Brücken in der Anaphase und vielen anderen Chromosomenabberationen führt. Dies deutet auf Fehler in der Segregation der Chromosomen hin. Condensin I scheint keine Rolle in der Chromosomenkondensation bis zur Metaphase zu spielen, da in angefärbten mitotischen Zellkernen der *cbl*-Mutanten die Chromosomen stark kondensiert erscheinen und Metaphase-Platten bilden.

Die Komponenten des Condensin-Komplexes wurden als Chromosomen assoziierte Proteine in verschiedenen Organismen entdeckt (Bhat et al., 1996; Chuang et al., 1994; Hirano und Mitchison, 1994; Jessberger et al., 1996; Lehmann et al., 1995; Lewis und Laemmli, 1982; Saitoh et al., 1994; Saka et al., 1994; Strunnikov et al., 1995). Funktionelle Studien führten zu widersprüchlichen Ergebnissen. Neben der zuerst entdeckten Rolle in der Kondensation der mitotischen Chromosomen scheint es in verschiedenen Systemen Funktionen in der Segregation der Chromosomen zu haben. Außerdem gibt es Hinweise

auf weitere Funktionen, z. B. bei der Genprogrammierung, Gene Silencing und Transkriptions-regulation.

Eine Rolle des Condensin I Komplexes bei der Chromosomenkondensation wurde bei Studien in *Xenopus laevis*, in denen auch erstmals der Condensin-Komplex beschrieben wurde, nachgewiesen. Unbefruchtete *Xenopus*-Eier sind in der Metaphase der zweiten meiotischen Teilung arretiert. Wenn Spermien in diesem Extrakt inkubiert werden, beginnen ihre Chromosomen zu kondensieren und ähneln mitotischen Chromosomen, bestehen jedoch aus nur einem unreplizierten Chromatid (Hirano et al., 1997; Hirano und Mitchison, 1994). Daraus wurde eine Rolle des Condensin-Komplexes als Motor der mitotischen Chromosomen-Kondensation hergeleitet (Hirano et al., 1997; Hirano und Mitchison, 1994). Dass diese Ergebnisse für die Rolle des Condensins in *Xenopus* oder anderen Metazoen repräsentativ sind, ist fraglich, da in den Versuchen mit Ei-Extrakten haploide Chromosomen in einer sehr speziellen Mikroumgebung verwendet wurden.

In Condensin-Mutanten von *Schizosaccharomyces pombe* und *Saccharomyces cerevisiae* treten Defekte sowohl bei der Chromosomen-Kondensation als auch -Segregation auf (Lavoie et al., 2000; Ouspenski et al., 2000; Saka et al., 1994; Strunnikov et al., 1995; Sutani et al., 1999). Bei Studien in *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* konnte wiederum keine Rolle des Condensin-Komplexes für die Chromosomen-Kondensation nachgewiesen werden, wohl aber bei der Chromosomensegregation, wie sie auch im Zebrafisch zu beobachten ist (Bhat et al., 1996; Coelho et al., 2003; Hagstrom et al., 2002; Steffensen et al., 2001). In beiden Organismen wurde in Condensin-Mutanten eine starke Kondensation der DNA in der Metaphase beobachtet und es formte sich auch eine bipolare Metaphase-Platte. In der Anaphase wurden jedoch Chromosomen-Brücken, ähnlich den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen, gebildet, die auf Grund von unvollständiger Chromosomensegregation auftreten (Bhat et al., 1996; Hagstrom et al., 2002; Steffensen et al., 2001).

Auch in weiteren Knockdown oder Knockout-Studien konnte in verschiedenen Systemen (*Drosophila*, *C. elegans*, Hühnerzellen, humane Zellen) keine signifikante Störung der Chromosomen-Kondensation nachgewiesen werden, wohl aber schwere Defekte bei der Chromosomen-Segregation in Zellkultur oder embryonalen Zellen (Cobbe et al., 2006; Coelho et al., 2003; Dej et al., 2004; Gassmann et al., 2004; Hirota et al., 2004; Hudson et al., 2003; Watrin und Legagneux, 2005). Diese Studien umfassten sowohl die von Condensin I und II verwendeten Untereinheiten SMC2 und SMC4, die jeweils nur von einem Condensin verwendeten regulatorischen Untereinheiten, oder Doppel-Knockout von regulatorischen Untereinheiten beider Komplexe.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Defekte während der Zellteilungen ähneln sehr den Defekten in *Drosophila* und *C. elegans* und sprechen daher für eine Rolle des Condensin I Komplexes für die Segregation aber nicht bei der Kondensation.

Wenn Condensin I wie zuerst vermutet (Hirano et al., 1997; Hirano und Mitchison, 1994), eine Rolle als Initiator der Chromosomen-Kondensation spielen würde, würde man

zudem erwarten, dass es bei Beginn der Kondensation in der Prophase im Zellkern lokalisiert ist. In der Interphase ist es jedoch im Zytoplasma lokalisiert (Ball et al., 2002; Cabello et al., 2001; Hirota et al., 2004; Maeshima und Laemmli, 2003; Schmiesing et al., 2000; Steffensen et al., 2001) und erst nach dem Abbau der Kernhülle in der Prometaphase gelangt es zum Chromatin (Hirota et al., 2004; Ono et al., 2004). Es ist somit wahrscheinlich, dass ein anderer Mechanismus für die Kondensation der Chromosomen in mitotischen Zellen existiert, der für die Kondensation der Chromosomen in der Prophase hauptsächlich ist und Condensin dabei, wenn überhaupt nur eine untergeordnete Rolle spielt. Hier besteht allerdings noch Klärungsbedarf, da es Hinweise auf eine zumindest geringe Konzentration von Condensin I im Zellkern auch während der Interphase gibt (Cabello et al., 2001; Uzbekov et al., 2003).

Es wurde beobachtet, dass Condensin in mitotischen Chromosomen von *Xenopus*, HeLa-Zellen und Hefe entlang der Achse der einzelnen Schwester-Chromatiden und im Centromer lokalisiert (Losada et al., 1998; Maeshima und Laemmli, 2003; Saitoh et al., 1994; Viera et al., 2007) (Abb. 29). Im Gegensatz dazu lokalisiert Cohesin entlang der Interchromatid-Achse und verbindet die Schwester-Chromatiden (Losada et al., 1998; Viera et al., 2007). Dies spricht dafür, dass es eine Rolle in der Organisation der Schwesterchromatiden spielt. Auch in *Xenopus*-Ei-Extrakten wurde in weiteren Versuchsanordnungen, in denen replizierte (und nicht haploide Chromosomen von Spermien) Chromosomen verwendet wurden, festgestellt, dass in Abwesenheit von Condensin I die Trennung und Formation der Chromatiden gestört ist, aber nicht die Kondensation der Chromosomen (Hirano et al., 1997; Hirano und Mitchison, 1993).

Der Condensin-Knockdown- oder -Knockout in *C. elegans*, *Drosophila* und humanen Zellen führt zur Instabilität der Centromere, so dass sie den Zugkräften der Spindel während der Mitose nicht mehr Stand halten (Gerlich et al., 2006; Hagstrom et al., 2002; Oliveira et al., 2005; Savvidou et al., 2005). Diese Untersuchungen sprechen ebenfalls für eine Rolle von Condensin I in der Organisation der kondensierten Schwester-Chromatiden und ihrer korrekten Separation während der Anaphase.

In meinen Untersuchungen konnte ich zeigen, dass der Condensin-I-Komplex eine Rolle bei der Chromosomensegregation spielt. Welche Chromosomen-Strukturen in der *cbf*-Mutante des Zebrafisches betroffen sind und für die beobachteten Anaphase-Brücken verantwortlich sind, müsste durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Färbungen, die Aufschluss über die Struktur der Chromosomen, die korrekte Trennung der Chromatiden, die Centromere, die Spindel-Apparate etc. geben, wären nötig. Es ist denkbar, dass eine Trennung der Chromatiden nicht vollständig erfolgt, dass die Spindel nicht fest genug an den Chromosomen anhaftet oder dass die Längsachse der Schwester-Chromatiden oder die Centromere nicht stabil sind und den Zugkräften nicht Stand halten. Auch die Frage der subzellulären Lokalisation von CAP-G im Zebrafisch muss in diesem Zusammenhang geklärt werden. Da der Antikörper gegen das humane CAP-G im

Zebrafisch nicht kreuzreagiert, können weitere Studien mit HA-markiertem Protein (durch Injektion HA-markierter RNA) die gewünschte Information liefern.

Die in *cbf*-Mutanten beobachteten größeren und abnorm geformten Zellkerne könnten aneuploid und ein Resultat der Segregations-Defekte sein. Auf Grund unvollständiger Trennung der Chromosomen während der Anaphase könnten die Chromosomen entweder ungleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt worden sein oder die Zellteilung wurde nicht beendet und es blieb eine polyploide Zelle zurück. Segregations-Fehler wie die hier beobachteten Chromosomen-Brücken, können zu pathologischen Schäden im Genom führen, wie sie z. B. in vielen Krebszellen auftreten (Jallepalli und Lengauer, 2001). Zu diesen Schäden gehören chromosomale Instabilität und aneuploide Zellkerne.

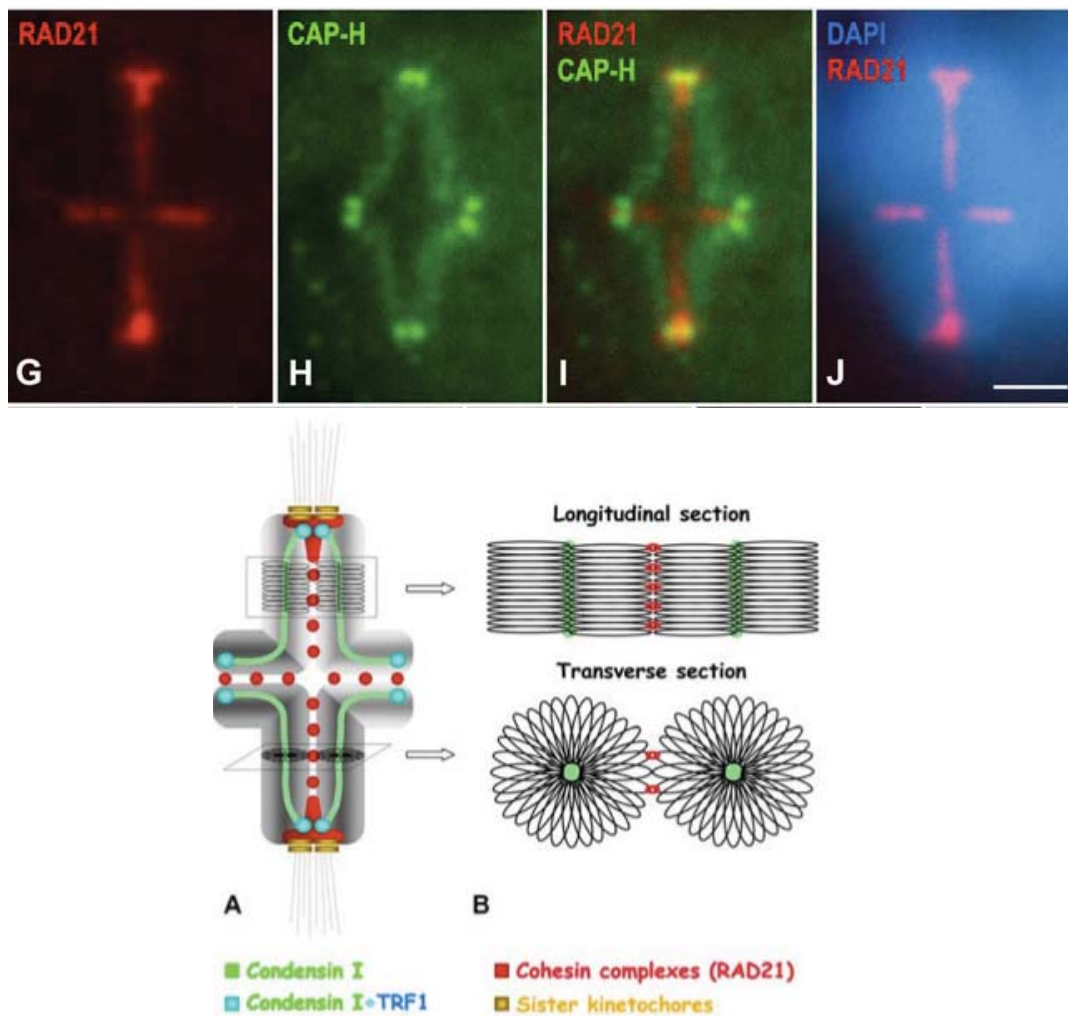


Abb. 29: Lokalisation der Cohesin-Komponente RAD21 und CAP-H (Condensin) während der Mitose auf auseinanderweichenden Schwesterchromatiden, aus (Viera et al., 2007). Kinetochore oben und unten, Telomere links und rechts.

In Übereinstimmung mit den hier im Zebrafisch beschriebenen großen Zellkernen wurden in verschiedenen *Drosophila*- und *C. elegans*-Studien mit Condensin-Untereinheiten ebenfalls große Zellkerne, Zellen mit zwei oder drei Kernen und Zellkerne unterschiedlicher Größe gefunden (Cobbe et al., 2006; Hagstrom et al., 2002; Oliveira et al., 2005; Steffensen et al., 2001). Auf Grund von nicht funktionellen Condensin-Untereinheiten (CAP-H bei *Drosophila* und SMC4 und SMC2/MIX-1 bei *Drosophila* und *C. elegans*) traten aneuploide Zellen oder Zellen mit zwei oder drei Zellkernen auf, die auf ungleichmäßige Verteilung der Chromosomen oder unvollständige Zellteilungen zurückgeführt wurden.

Um Aussagen über die Natur der unregelmäßig geformten Zellkerne in der *cbl*-Mutante zu treffen, wären weitere Experimente notwendig. Eine Färbung mit Zellmembran-Markern könnte zeigen, ob ebenso wie bei *Drosophila* und *C. elegans*, Zellen mit mehreren Kernen auftreten. Die tatsächliche Menge der in den Zellen enthaltenen DNA wäre mit Durchflusszytometrie nachzuweisen, um so festzustellen, ob aneuploide Zellen vorliegen. Eine Messung der Intensität der DAPI-Färbung, die eventuell eine Aussage über die DNA-Menge zuließe, war nicht aussagekräftig, da durch die Dicke der Vibratonschnitte die Intensität der DAPI-Färbung stark variiert.

Obwohl die Details der Funktion nicht geklärt werden konnten, zeigen die Ergebnisse und ihr Vergleich mit denen aus anderen Organismen, dass Condensin bei der Segregation der Chromosomen in neuronalen Geweben des Zebrafischs eine Rolle spielt.

4.1.2 Die Rolle von zCAP-G im Nervensystem

Die *cbl*-Mutante des Zebrafisches ist makroskopisch durch auffällig kleine Augen charakterisiert und die genauere Untersuchung in der vorliegenden Arbeit zeigt, dass nicht nur im Auge sondern im gesamten Nervensystem eine große Anzahl apoptotischer Zellen zu finden ist. In meiner Analyse habe ich charakterisiert, welche Zellen in der *cbl*-Mutante apoptotisch werden und durch welchen Mechanismus.

Eine nahe liegende Möglichkeit ist, dass die Zellen, bei denen Segregationsdefekte auftreten und somit die Zellteilung nicht beenden können, die Apoptose einleiten. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Zellen, die nach einer unvollständigen Teilung des Chromatins aneuploid geworden sind, erst bei der folgenden Mitose apoptotisch werden.

In der *cbl*-Mutante scheinen aber weder die Zellen mit Anaphase-Brücken noch die vermutlich aneuploiden Zellen Apoptose einzuleiten, da sie nicht die typischen Merkmale apoptotischer Zellen, wie starke Kondensation oder Fragmentierung des Chromatins aufweisen (Kerr et al., 1995). Stattdessen sind durch gleichzeitige Färbung von phosphoryliertem Histone 3 und TUNEL-Färbung Zellen nachzuweisen, bei denen die für die Apoptose typische DNA-Fragmentierung schon während der Mitose stattfindet.

Auch die Beobachtung, dass sowohl bei *Drosophila*- als auch bei *C. elegans*-Condensin-Mutanten die Teilung von embryonalen Zellen mit Anaphase-Brücken bis zur Zytokinese weiter läuft, diese zwar eingeleitet wird, dann aber scheitert, stützt die These, dass diese Defekte nicht für die Apoptosen ursächlich sind (Bhat et al., 1996; Cobbe et al., 2006; Hagstrom et al., 2002; Oliveira et al., 2005; Savvidou et al., 2005). Apoptose als Folge gescheiterter Zellteilungen wurde in keiner Veröffentlichung beschrieben und in einigen explizit ausgeschlossen (z. B. Cobbe et al., 2006). In vielen Condensin-defekten Zellen wurden darüber hinaus polyploide Zellen beschrieben, die einen mehrfachen Chromosomensatz besitzen und offensichtlich nicht während der Mitose ihren Zelltod eingeleitet haben (Cobbe et al., 2006; Hagstrom et al., 2002; Oliveira et al., 2005; Steffensen et al., 2001). Dass die apoptotischen Zellen in der *cbl*-Mutante auf Grund struktureller Defekte ihren Tod einleiten, erscheint deshalb unwahrscheinlich, und wirft die Frage auf, was der Grund für diese Apoptosen ist. Von der Apoptose sind in der *cbl*-Mutante ausschließlich Zellen des zentralen Nervensystems betroffen, obwohl es zu erwarten wäre, dass die Struktur der mitotischen Chromosomen in allen Zellen gleichermaßen gewährleistet sein müsste und auch dort Apoptose verursachen würde.

Die in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal beschriebene Expression einer Komponente des Condensin-Komplexes in einem mehrzelligen Organismus ist ab einem Alter von 24 hpf nur im Nervensystem festzustellen. Dies wäre nicht zu erwarten, wenn Condensin I ausschließlich eine Rolle in der Chromosomenstruktur spielen würde. In diesem Fall sollte die Expression in allen proliferierenden Geweben zu sehen sein.

Diesem Phänomen könnte unterschiedliches Ansprechverhalten der Gewebe zu Grunde liegen, da das sehr teilungsaktive ZNS einen hohen Umsatz an Haushaltsfaktoren

benötigt und die hohe Transkriptionsrate lediglich diesem Umstand geschuldet sein könnte.

Andererseits wurde festgestellt, dass die Condensin-Untereinheiten hCAP-E (SMC2) und hCAP-G sehr stabil sind und deren Umsatz sehr langsam erfolgt (Takemoto et al., 2004). Dies würde eher eine geringe Transkriptionsrate benötigen. Ebenso ist eine hohe Transkriptionsrate im ZNS, die wesentlich höher ist als nötig, ist auch von anderen Genen, wie z. B. MCM5 bekannt (Ryu et al., 2005; Tye, 1999). Dass die mitotischen Defekte, wie die Chromatin-Brücken, nicht eher in allen Körpergeweben auftreten, könnte ebenso daran liegen, dass die maternale Versorgung mit wt-*cap-g* in vielen Geweben über mehrere Tage ausreicht, im Nervengewebe jedoch durch das hohe Level an mutantern *cap-g* nicht mehr wirksam ist und die mitotischen Defekte folglich (neben den zur Apoptose führenden) zuerst im Nervensystem auftreten. Einen Hinweis auf die Funktion in weiteren Körperzellen könnten die leicht vergrößerten Zellen im Knorpelgewebe liefern.

Die Beobachtung, dass die mit anti-*zcap-g*-Morpholino-Oligonukleotiden behandelten Embryonen einen stärkeren Phänotyp als die Mutante aufweisen, könnte die These einer weiteren Funktion von Condensin I im Nervensystem stützen, da hier auch die Translation der maternalen mRNA blockiert wird, nicht jedoch das mitgelieferte Protein. Die Morpholino-injizierten Embryonen weisen kaum Apoptose auf, sie scheinen sich nicht oder nur langsam bis zur Neurogenese zu entwickeln, was aber noch zu untersuchen ist.

Die Spezifität und Höhe der Expression und der stärkere Phänotyp der Morpholino-injizierten Embryonen spricht also für eine weitere Funktion im Nervensystem, zumindest der CAP-G-Untereinheit.

Ein auffälliges Charakteristikum der *cbl*-Mutante ist die große Zahl apoptotischer Zellen im zentralen Nervensystem. Daraus resultiert eine Reduktion der Zellzahl in der neuronalen Retina und im zentralen Nervensystem, die zu kleinen Augen führt.

Wie oben ausgeführt, können die beobachteten Chromatin-Brücken und aneuploiden Zellen nicht schlüssig erklären, warum die Zellen im ZNS apoptotisch werden. Dies deutet auf zwei unabhängige Funktionen von CAP-G im Zebrafisch hin: Einerseits eine Rolle bei der Struktur der Chromosomen während der Mitose und andererseits eine spezifischere Rolle bei neurogenetischen Zellteilungen im ZNS. Die beschriebenen Apoptosen im Nervensystem wären dann dieser zweiten Funktion zuzuschreiben.

Das *zcap-g*-Expressionsmuster korreliert mit dem der Apoptosen und unterstützt die These einer zweiten, spezifischeren Funktion des Condensin-I-Komplexes ausschließlich in neurogenetischen Zellteilungen.

Wenn CAP-G eine weitere Funktion im Nervensystem hat, worin besteht dann seine Rolle? Zur Beantwortung dieser Frage tragen die Charakteristika sowohl des Gewebes als auch des Proteins bei. Zellen, die sich nicht mehr teilen, deaktivieren ihr Zellzyklus-

Kontrollsystem und treten in eine Ruhephase - G₀ genannt - ein. Bei vielen Zellen ist dieser Zustand reversibel, aber neuronale Zellen (und einige andere, z. B. Skelettmuskelzellen (Alberts et al., 2002)) treten nach ihrer letzten Teilung in einen Zustand der “terminal differentiation” ein, der nicht reversibel ist. In ihnen werden Zellzyklus-Gene, wie Cdk- und Cyclin-Gene, dauerhaft abgeschaltet (Alberts et al., 2002). In der letzten, neurogenetischen Zellteilung - und somit dem Übergang zur G₀-Phase - laufen spezielle Prozesse ab, in denen Condensin oder einzelne Untereinheiten eine Rolle spielen könnten.

Eine mögliche Funktion von CAP-G könnte hierbei eine direkte, aktive Rolle im Checkpoint-System des Zellzyklus während der neurogenetischen Zellteilung sein, die den Eintritt in die G₀-Phase ermöglicht. Eine weitere Möglichkeit wäre eine indirekte Einflussnahme von CAP-G auf den Zellzyklus durch eine weitere Funktion in der Determination der Nervenzellen durch epigenetische Prozesse wie Chromatin Remodeling.

Condensin scheint prädestiniert für eine Rolle im Checkpoint-System des Zellzyklus, da es auf Grund seiner Lokalisation im Chromatin “am Ort des Geschehens” ist und es neben den beiden DNA-bindenden Komponenten drei für Signalfunktionen freie Untereinheiten besitzt.

Ich konnte zeigen, dass die beginnende Apoptose in der Retina stark mit der Mitose korreliert und somit an den Zellzyklus gekoppelt ist. Der Hauptmechanismus der Zellzyklus-Regulation ist die Phosphorylierung durch Zellzyklus-abhängige (Cell Cycle Depending) Kinasen (Cdks). Es ist bekannt, dass mehrere Condensin-Untereinheiten von Kinasen der Zellzyklus-Maschinerie phosphoryliert werden, dazu gehören CK2 (Takemoto et al., 2006), Cdc2 (Hagstrom et al., 2002; Kimura et al., 2001; Kimura et al., 1998), mitotic Cdk (Sutani et al., 1999) und Ipl1/Aurora B/AIR-2 (Lavoie et al., 2004). Es wurden in *in vitro*-Experimenten Auswirkungen dieser Phosphorylierungen beschrieben wie z. B. Aktivierung und Deaktivierung des Condensin-Komplexes, “Supercoiling”, “Knotting” und Kondensation von DNA und Lokalisation von Condensin. Eine *in vivo*-Funktion wurde aber bisher nicht gefunden und viele Ergebnisse sind widersprüchlich. So ist die Phosphorylierung von Ycg1p(CAP-G) durch Ipl1/Aurora B/AIM-2 nicht notwendig für die Chromosomen-Kondensation in *Saccharomyces cerevisiae* (Lavoie et al., 2004). Für die Lokalisation von Barren/CAP-H in *Drosophila* und *C. elegans* auf mitotischen Chromosomen ist zwar die Anwesenheit von Ipl1/Aurora B/AIM-2 notwendig, es ist jedoch nicht klar, ob die Phosphorylierung von Condensin-Untereinheiten oder anderen Proteinen eine Rolle spielt (Giet und Glover, 2001; Hagstrom et al., 2002).

Condensin scheint aber nicht notwendig für die korrekte Lokalisierung anderer Zellzyklus-Komponenten, die notwendig für das Fortschreiten des Zellzyklus sind, zu sein (Oliveira et al., 2005; Steffensen et al., 2001). So wurde in der *Drosophila* SMC4-Mutante *gluon* die Lokalisation von nicht näher benannten Checkpoint-Proteinen und mitotischen Regulatoren überprüft und für normal befunden (Steffensen et al., 2001).

Auch die Lokalisation von INCENP (Inner Centromere Protein), ein für die Zellteilung essenzieller Faktor, in der mittleren Zone der Spindel in *Drosophila* ist bei defektem Barren/CAP-H normal, obwohl Aneuploidie und stark polyploide Zellen auftreten (Oliveira et al., 2005). Mit der Phosphorylierung wird der Condensin-Komplex demzufolge eher reguliert (z. B. Regulierung der Lokalisation durch die nicht-SMC-Untereinheiten, Regulierung der ATPase-Aktivität der SMC-Untereinheiten), als dass er selbst eine Signalfunktion ausübt und damit das Fortschreiten des Zellzyklus beeinflusst.

Einen weiteren Hinweis auf die Rolle im Zellzyklus kann der Zeitpunkt der Expression von Zellzyklus-Markern geben. Die Expression von *pcna*, *ath5* und *elav3* ist in *cbl*-Embryonen nicht verzögert. Dies spricht ebenso gegen eine direkte, aktive Rolle im Checkpoint-System des Zellzyklus, wie die Tatsache, dass scheinbar kein Arrest der Zellen in der Mitose eintritt. In der *Drosophila*-Mutante *gluon*, bei der ebenfalls kein Arrest in den Neuroblasten (bei denen Apoptose auftritt), wohl aber in den embryonalen Zellen, auftritt, scheint kein Checkpoint-Arrest den Fortgang des Zellzyklus zu bremsen (Steffensen et al., 2001).

Neben einer reinen Signalfunktion von CAP-G ist es möglich, dass es eine Rolle bei der epigenetischen Veränderung von Chromatin spielt. Dies würde im Zebrafisch - und auch bei anderen Tieren - dann zur für die Neurogenese notwendigen Unterdrückung und/oder Aktivierung der Expression bestimmter Gene führen.

Zu epigenetischen Veränderungen zählen alle Modifikationen von Chromatin, die über die Zellteilung hinaus stabil sind, aber nicht die DNA-Sequenz verändern. Sie spielen eine Rolle bei der zellulären Differenzierung, indem sie das für die Zellart charakteristische Muster der Genexpression stabilisieren. Obwohl die mitotische Chromosomen-Kondensation in keinem Zusammenhang mit der Regulation von Genexpression zu stehen scheint, gibt es Anhaltspunkte für die Rolle von Condensin-Untereinheiten bei epigenetisch regulativen Prozessen. So ist z. B. die Condensin I Untereinheit MIX-1, ein Ortholog von SMC2, bei *C. elegans* sowohl eine Komponente des einzigen Condensin-Komplexes als auch des Dosage-Condensation-Komplexes DCC (Lieb et al., 1998). Dieser Dosage-Compensation-Komplex verringert in Hermaphroditen von *C. elegans* die Transkription der zwei X-Chromosomen (Meyer, 2000). Er besteht aus den SMC-Untereinheiten DPY-27 und MIX-1, sowie DPY-26 und DPY-27, die den Condensin-Untereinheiten SMC4, SMC2, CAP-H und CAP-D2 des Zebrafisches entsprechen (Chuang et al., 1994; Lieb et al., 1996).

Die Funktionen scheinen auf den ersten Blick sehr unterschiedlich zu sein, zeichnen sich jedoch beide durch die Bindung an DNA und ihrer Verformung aus. Der Dosage-Compensation-Complex bindet an bestimmte Stellen im X-Chromosom, die durch die DNA-Sequenz in Kooperation mit Chromatin-Signalen bestimmt werden und verhindert die Transkription möglicherweise durch Beeinträchtigung der Transkriptions-Initiation (Ercan et al., 2007).

Für verschiedene Condensin-Untereinheiten wurde bereits die Beteiligung an anderen epigenetischen Prozessen beschrieben:

In *Saccharomyces cerevisiae* wurde ein Zusammenhang zwischen Gene-Silencing am Mating Type Locus und Condensin beschrieben (Bhalla et al., 2002). Mutationen in YCS4/CAP-D2 und SMC4 führen dazu, dass die Zellen sowohl α - als auch α -Gene exprimieren. Infolge dessen ist der Mating Type nicht mehr determiniert und die Zellen reagieren nicht mehr mit Wachstumsstopp und Auswachsen von Fortsätzen auf Nachbarzellen.

In *Drosophila* wurde eine Funktion von Barren/CAP-H in der Regulation der Transkription Polycomb Group Genen beschrieben (Lupo et al., 2001). Barren/CAP-H bindet über Topoisomerase II an regulatorische Elemente des *Abd-B*-Gens und sorgt so epigenetisch für eine Vererbung des Gen-Expressions-Status. Durch eine Änderung der Chromosomen-Domänen-Topologie wird die Körper-Segment-Identität aufrechterhalten.

Eine weitere Funktion durch Änderung der Chromosomen-Topologie scheint CAP-G in mitotischen humanen Zellen auszuführen. Es bindet an HSF2 und spielt so eine Rolle beim Gene Bookmarking (Xing et al., 2005). Der Transkriptionsfaktor HSF2 bindet während der Mitose an den Promotor des Heat Shock Protein-Gens *hsp70i*, dessen Sequenz für die Stress-Antwort ablesbar bleiben muss und nicht kondensiert.

Ein Hinweis auf eine Rolle des Condensin-Komplexes bei der DNA-Methylierung könnte die Fähigkeit der DNA-Methyltransferase DNMT3B sein, *in vitro* und *in vivo* an hCAP-C, -E und -G zu binden (Geiman et al., 2004).

Condensin scheint also in vielerlei Hinsicht die Chromatin-Struktur dauerhaft zu verändern und so seine Funktion zu beeinflussen. Somit ist es plausibel, den beobachteten Defekt im Nervensystem der *cbl*-Mutante auf eine Rolle bei der epigenetischen Chromatinveränderung zurückzuführen, der an der finalen Schicksalsdetermination der Neuronen beteiligt ist.

Die Zebrafisch-Mutante *creature from the black lagoon* stellt für die Beantwortung dieser Fragen ein sehr gutes Modell dar.

5 Bibliografie

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science.

Alexiades, M. R. und Cepko, C. L. (1997). Subsets of retinal progenitors display temporally regulated and distinct biases in the fates of their progeny. *Development* **124**, 1119-31.

Amsterdam, A., Burgess, S., Golling, G., Chen, W., Sun, Z., Townsend, K., Farrington, S., Haldi, M. und Hopkins, N. (1999). A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish. *Genes Dev* **13**, 2713-24.

Andrade, M. A. und Bork, P. (1995). HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet* **11**, 115-6.

Ball, A. R., Jr., Schmiesing, J. A., Zhou, C., Gregson, H. C., Okada, Y., Doi, T. und Yokomori, K. (2002). Identification of a chromosome-targeting domain in the human condensin subunit CNAP1/hCAP-D2/Eg7. *Mol Cell Biol* **22**, 5769-81.

Baye, L. M. und Link, B. A. (2007). The disarrayed mutation results in cell cycle and neurogenesis defects during retinal development in zebrafish. *BMC Dev Biol* **7**, 28.

Bernardos, R. L., Barthel, L. K., Meyers, J. R. und Raymond, P. A. (2007). Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Muller glia that function as retinal stem cells. *J Neurosci* **27**, 7028-40.

Bhalla, N., Biggins, S. und Murray, A. W. (2002). Mutation of YCS4, a budding yeast condensin subunit, affects mitotic and nonmitotic chromosome behavior. *Mol Biol Cell* **13**, 632-45.

Bhat, M. A., Philp, A. V., Glover, D. M. und Bellen, H. J. (1996). Chromatid segregation at anaphase requires the barren product, a novel chromosome-associated protein that interacts with Topoisomerase II. *Cell* **87**, 1103-14.

- Cabello, O. A., Eliseeva, E., He, W. G., Youssoufian, H., Plon, S. E., Brinkley, B. R. und Belmont, J. W.** (2001). Cell cycle-dependent expression and nucleolar localization of hCAP-H. *Mol Biol Cell* **12**, 3527-37.
- Cayouette, M., Poggi, L. und Harris, W. A.** (2006). Lineage in the vertebrate retina. *Trends Neurosci* **29**, 563-70.
- Chakrabarti, S., Streisinger, G., Singer, F. und Walker, C.** (1983). Frequency of gamma-Ray Induced Specific Locus and Recessive Lethal Mutations in Mature Germ Cells of the Zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Genetics* **103**, 109-23.
- Chuang, P. T., Albertson, D. G. und Meyer, B. J.** (1994). DPY-27: a chromosome condensation protein homolog that regulates *C. elegans* dosage compensation through association with the X chromosome. *Cell* **79**, 459-74.
- Cobbe, N., Savvidou, E. und Heck, M. M.** (2006). Diverse mitotic and interphase functions of condensins in *Drosophila*. *Genetics* **172**, 991-1008.
- Coelho, P. A., Queiroz-Machado, J. und Sunkel, C. E.** (2003). Condensin-dependent localisation of topoisomerase II to an axial chromosomal structure is required for sister chromatid resolution during mitosis. *J Cell Sci* **116**, 4763-76.
- Dej, K. J., Ahn, C. und Orr-Weaver, T. L.** (2004). Mutations in the *Drosophila* condensin subunit dCAP-G: defining the role of condensin for chromosome condensation in mitosis and gene expression in interphase. *Genetics* **168**, 895-906.
- Dodd, A., Chambers, S. P. und Love, D. R.** (2004). Short interfering RNA-mediated gene targeting in the zebrafish. *FEBS Lett* **561**, 89-93.
- Dowling, J. E.** (1987). The Retina: An Approachable Part of the Brain. Cambridge, MA: The Belknap Press of Harvard University Press.
- Draper, B. W., McCallum, C. M., Stout, J. L., Slade, A. J. und Moens, C. B.** (2004). A high-throughput method for identifying N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-induced point mutations in zebrafish. *Methods Cell Biol* **77**, 91-112.
- Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Neuhauss, S. C., Malicki, J., Stemple, D. L., Stainier, D. Y., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Rangini, Z. et al.** (1996). A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* **123**, 37-46.
- Easter, S. S., Jr. und Malicki, J. J.** (2002). The zebrafish eye: developmental and genetic analysis. *Results Probl Cell Differ.* **40**, 346-70.
- Easter, S. S., Jr. und Nicola, G. N.** (1996). The development of vision in the zebrafish (*Danio rerio*). *Dev Biol* **180**, 646-63.
- Ekstrom, P. und Johansson, K.** (2003). Differentiation of ganglion cells and amacrine cells in the rat retina: correlation with expression of HuC/D and GAP-43 proteins. *Brain Res Dev Brain Res* **145**, 1-8.

-
- Ercan, S., Giresi, P. G., Whittle, C. M., Zhang, X., Green, R. D. und Lieb, J. D.** (2007). X chromosome repression by localization of the *C. elegans* dosage compensation machinery to sites of transcription initiation. *Nat Genet* **39**, 403-8.
- Fashena, D. und Westerfield, M.** (1999). Secondary motoneuron axons localize DM-GRASP on their fasciculated segments. *J Comp Neurol* **406**, 415-24.
- Gaiano, N., Amsterdam, A., Kawakami, K., Allende, M., Becker, T. und Hopkins, N.** (1996). Insertional mutagenesis and rapid cloning of essential genes in zebrafish. *Nature* **383**, 829-32.
- Gassmann, R., Vagnarelli, P., Hudson, D. und Earnshaw, W. C.** (2004). Mitotic chromosome formation and the condensin paradox. *Exp Cell Res* **296**, 35-42.
- Geiman, T. M., Sankpal, U. T., Robertson, A. K., Chen, Y., Mazumdar, M., Heale, J. T., Schmiesing, J. A., Kim, W., Yokomori, K., Zhao, Y. et al.** (2004). Isolation and characterization of a novel DNA methyltransferase complex linking DNMT3B with components of the mitotic chromosome condensation machinery. *Nucleic Acids Res* **32**, 2716-29.
- Gerlich, D., Hirota, T., Koch, B., Peters, J. M. und Ellenberg, J.** (2006). Condensin I stabilizes chromosomes mechanically through a dynamic interaction in live cells. *Curr Biol* **16**, 333-44.
- Giet, R. und Glover, D. M.** (2001). *Drosophila* aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J Cell Biol* **152**, 669-82.
- Grunwald, D. J., Kimmel, C. B., Westerfield, M., Walker, C. und Streisinger, G.** (1988). A neural degeneration mutation that spares primary neurons in the zebrafish. *Dev Biol* **126**, 115-28.
- Grunwald, D. J. und Streisinger, G.** (1992a). Induction of mutations in the zebrafish with ultraviolet light. *Genet Res* **59**, 93-101.
- Grunwald, D. J. und Streisinger, G.** (1992b). Induction of recessive lethal and specific locus mutations in the zebrafish with ethyl nitrosourea. *Genet Res* **59**, 103-16.
- Haffter, P. und Nüsslein-Volhard, C.** (1996). Large scale genetics in a small vertebrate, the zebrafish. *Int J Dev Biol* **40**, 221-7.
- Hagstrom, K. A., Holmes, V. F., Cozzarelli, N. R. und Meyer, B. J.** (2002). *C. elegans* condensin promotes mitotic chromosome architecture, centromere organization, and sister chromatid segregation during mitosis and meiosis. *Genes Dev* **16**, 729-42.
- Hayes, N. L. und Nowakowski, R. S.** (2000). Exploiting the dynamics of S-phase tracers in developing brain: interkinetic nuclear migration for cells entering versus leaving the S-phase. *Dev Neurosci* **22**, 44-55.

Hirano, T. (2005). Condensins: organizing and segregating the genome. *Curr Biol* **15**, R265-75.

Hirano, T. (2006). At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 311-22.

Hirano, T., Kobayashi, R. und Hirano, M. (1997). Condensins, chromosome condensation protein complexes containing XCAP-C, XCAP-E and a *Xenopus* homolog of the *Drosophila* Barren protein. *Cell* **89**, 511-21.

Hirano, T. und Mitchison, T. J. (1993). Topoisomerase II does not play a scaffolding role in the organization of mitotic chromosomes assembled in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Biol* **120**, 601-12.

Hirano, T. und Mitchison, T. J. (1994). A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation in vitro. *Cell* **79**, 449-58.

Hirota, T., Gerlich, D., Koch, B., Ellenberg, J. und Peters, J. M. (2004). Distinct functions of condensin I and II in mitotic chromosome assembly. *J Cell Sci* **117**, 6435-45.

Hopfner, K. P., Karcher, A., Shin, D. S., Craig, L., Arthur, L. M., Carney, J. P. und Tainer, J. A. (2000). Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell* **101**, 789-800.

Hopfner, K. P. und Tainer, J. A. (2003). Rad50/SMC proteins and ABC transporters: unifying concepts from high-resolution structures. *Curr Opin Struct Biol* **13**, 249-55.

Hu, M. und Easter, S. S. (1999). Retinal neurogenesis: the formation of the initial central patch of postmitotic cells. *Dev Biol* **207**, 309-21.

Hubbard, T., Barker, D., Birney, E., Cameron, G., Chen, Y., Clark, L., Cox, T., Cuff, J., Curwen, V., Down, T. et al. (2002). The Ensembl genome database project. *Nucleic Acids Res* **30**, 38-41.

Hubbard, T. J., Aken, B. L., Beal, K., Ballester, B., Caccamo, M., Chen, Y., Clarke, L., Coates, G., Cunningham, F., Cutts, T. et al. (2007). Ensembl 2007. *Nucleic Acids Res* **35**, D610-7.

Hudson, D. F., Vagnarelli, P., Gassmann, R. und Earnshaw, W. C. (2003). Condensin is required for nonhistone protein assembly and structural integrity of vertebrate mitotic chromosomes. *Dev Cell* **5**, 323-36.

Imanishi, Y., Li, N., Sokal, I., Sowa, M. E., Lichtarge, O., Wensel, T. G., Saperstein, D. A., Baehr, W. und Palczewski, K. (2002). Characterization of retinal guanylate cyclase-activating protein 3 (GCAP3) from zebrafish to man. *Eur J Neurosci* **15**, 63-78.

-
- Jager, H., Rauch, M. und Heidmann, S.** (2005). The *Drosophila melanogaster* condensin subunit Cap-G interacts with the centromere-specific histone H3 variant CID. *Chromosoma* **113**, 350-61.
- Jallepalli, P. V. und Lengauer, C.** (2001). Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. *Nat Rev Cancer* **1**, 109-17.
- Jessberger, R., Riwar, B., Baechtold, H. und Akhmedov, A. T.** (1996). SMC proteins constitute two subunits of the mammalian recombination complex RC-1. *Embo J* **15**, 4061-8.
- Johnson, S. L. und Zon, L. I.** (1999). Genetic backgrounds and some standard stocks and strains used in zebrafish developmental biology and genetics. *Methods Cell Biol* **60**, 357-9.
- Kaitna, S., Pasierbek, P., Jantsch, M., Loidl, J. und Glotzer, M.** (2002). The aurora B kinase AIR-2 regulates kinetochores during mitosis and is required for separation of homologous Chromosomes during meiosis. *Curr Biol* **12**, 798-812.
- Kerr, J. F., Gobe, G. C., Winterford, C. M. und Harmon, B. V.** (1995). Anatomical methods in cell death. *Methods Cell Biol* **46**, 1-27.
- Kim, C. H., Ueshima, E., Muraoka, O., Tanaka, H., Yeo, S. Y., Huh, T. L. und Miki, N.** (1996). Zebrafish *elav*/HuC homologue as a very early neuronal marker. *Neurosci Lett* **216**, 109-12.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. und Schilling, T. F.** (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* **203**, 253-310.
- Kimura, K., Cuvier, O. und Hirano, T.** (2001). Chromosome condensation by a human condensin complex in *Xenopus* egg extracts. *J Biol Chem* **276**, 5417-20.
- Kimura, K., Hirano, M., Kobayashi, R. und Hirano, T.** (1998). Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 in vitro. *Science* **282**, 487-90.
- Köhler, W., Schachtel, G. und Voleske, P.** (1992). Biostatistik. Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hong Kong Barcelona Budapest: Springer-Verlag.
- Larison, K. D. und Bremiller, R.** (1990). Early onset of phenotype and cell patterning in the embryonic zebrafish retina. *Development* **109**, 567-76.
- Lavoie, B. D., Hogan, E. und Koshland, D.** (2004). In vivo requirements for rDNA chromosome condensation reveal two cell-cycle-regulated pathways for mitotic chromosome folding. *Genes Dev* **18**, 76-87.
- Lavoie, B. D., Tuffo, K. M., Oh, S., Koshland, D. und Holm, C.** (2000). Mitotic chromosome condensation requires Brn1p, the yeast homologue of Barren. *Mol Biol Cell* **11**, 1293-304.

- Lehmann, A. R., Walicka, M., Griffiths, D. J., Murray, J. M., Watts, F. Z., McCready, S. und Carr, A. M.** (1995). The *rad18* gene of *Schizosaccharomyces pombe* defines a new subgroup of the SMC superfamily involved in DNA repair. *Mol Cell Biol* **15**, 7067-80.
- Lewis, C. D. und Laemmli, U. K.** (1982). Higher order metaphase chromosome structure: evidence for metalloprotein interactions. *Cell* **29**, 171-81.
- Lieb, J. D., Albrecht, M. R., Chuang, P. T. und Meyer, B. J.** (1998). MIX-1: an essential component of the *C. elegans* mitotic machinery executes X chromosome dosage compensation. *Cell* **92**, 265-77.
- Lieb, J. D., Capowski, E. E., Meneely, P. und Meyer, B. J.** (1996). DPY-26, a link between dosage compensation and meiotic chromosome segregation in the nematode. *Science* **274**, 1732-6.
- Liu, W. Y., Wang, Y., Sun, Y. H., Wang, Y., Wang, Y. P., Chen, S. P. und Zhu, Z. Y.** (2005). Efficient RNA interference in zebrafish embryos using siRNA synthesized with SP6 RNA polymerase. *Dev Growth Differ* **47**, 323-31.
- Losada, A., Hirano, M. und Hirano, T.** (1998). Identification of *Xenopus* SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. *Genes Dev* **12**, 1986-97.
- Lowe, J., Cordell, S. C. und van den Ent, F.** (2001). Crystal structure of the SMC head domain: an ABC ATPase with 900 residues antiparallel coiled-coil inserted. *J Mol Biol* **306**, 25-35.
- Lupo, R., Breiling, A., Bianchi, M. E. und Orlando, V.** (2001). *Drosophila* chromosome condensation proteins Topoisomerase II and Barren colocalize with Polycomb and maintain Fab-7 PRE silencing. *Mol Cell* **7**, 127-36.
- Maddox, P. S., Portier, N., Desai, A. und Oegema, K.** (2006). Molecular analysis of mitotic chromosome condensation using a quantitative time-resolved fluorescence microscopy assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15097-102.
- Maeshima, K. und Laemmli, U. K.** (2003). A two-step scaffolding model for mitotic chromosome assembly. *Dev Cell* **4**, 467-80.
- Malicki, J.** (1999). Development of the retina. *Methods Cell Biol* **59**, 273-99.
- Marcus, R. C., Delaney, C. L. und Easter, S. S., Jr.** (1999). Neurogenesis in the visual system of embryonic and adult zebrafish (*Danio rerio*). *off. Vis Neurosci* **16**, 417-24.
- Marcus, R. C. und Easter, S. S., Jr.** (1995). Expression of glial fibrillary acidic protein and its relation to tract formation in embryonic zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol* **359**, 365-81.
- Masai, I., Stemple, D. L., Okamoto, H. und Wilson, S. W.** (2000). Midline signals regulate retinal neurogenesis in zebrafish. *Neuron* **27**, 251-63.

-
- Meyer, B. J.** (2000). Sex in the worm counting and compensating X-chromosome dose. *Trends Genet* **16**, 247-53.
- Mullikin, J. C. und Ning, Z.** (2003). The phusion assembler. *Genome Res* **13**, 81-90.
- Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Haffter, P. und Nüsslein-Volhard, C.** (1994). Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes controlling development in a vertebrate. *Curr Biol* **4**, 189-202.
- Nasevicius, A. und Ekker, S. C.** (2000). Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet* **26**, 216-20.
- Nawrocki, L., BreMiller, R., Streisinger, G. und Kaplan, M.** (1985). Larval and adult visual pigments of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Vision Res* **25**, 1569-76.
- Neuwald, A. F. und Hirano, T.** (2000). HEAT repeats associated with condensins, cohesins, and other complexes involved in chromosome-related functions. *Genome Res* **10**, 1445-52.
- Nowak, M. und Hammerschmidt, M.** (2006). Ubc9 regulates mitosis and cell survival during zebrafish development. *Mol Biol Cell* **17**, 5324-36.
- Ohnuma, S. und Harris, W. A.** (2003). Neurogenesis and the cell cycle. *Neuron* **40**, 199-208.
- Oliveira, R. A., Coelho, P. A. und Sunkel, C. E.** (2005). The condensin I subunit Barren/CAP-H is essential for the structural integrity of centromeric heterochromatin during mitosis. *Mol Cell Biol* **25**, 8971-84.
- Ono, T., Fang, Y., Spector, D. L. und Hirano, T.** (2004). Spatial and temporal regulation of Condensins I and II in mitotic chromosome assembly in human cells. *Mol Biol Cell* **15**, 3296-308.
- Ono, T., Losada, A., Hirano, M., Myers, M. P., Neuwald, A. F. und Hirano, T.** (2003). Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells. *Cell* **115**, 109-21.
- Ouspenski, II, Cabello, O. A. und Brinkley, B. R.** (2000). Chromosome condensation factor Brn1p is required for chromatid separation in mitosis. *Mol Biol Cell* **11**, 1305-13.
- Pebernard, S., McDonald, W. H., Pavlova, Y., Yates, J. R., 3rd und Boddy, M. N.** (2004). Nse1, Nse2, and a novel subunit of the Smc5-Smc6 complex, Nse3, play a crucial role in meiosis. *Mol Biol Cell* **15**, 4866-76.
- Poggi, L., Vitorino, M., Masai, I. und Harris, W. A.** (2005). Influences on neural lineage and mode of division in the zebrafish retina in vivo. *J Cell Biol* **171**, 991-9.
- Postlethwait, J. H., Johnson, S. L., Midson, C. N., Talbot, W. S., Gates, M., Ballinger, E. W., Africa, D., Andrews, R., Carl, T., Eisen, J. S. et al.** (1994). A genetic linkage map for the zebrafish. *Science* **264**, 699-703.

- Ryu, S., Holzschuh, J., Erhardt, S., Ettl, A. K. und Driever, W.** (2005). Depletion of minichromosome maintenance protein 5 in the zebrafish retina causes cell-cycle defect and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18467-72.
- Saitoh, N., Goldberg, I. G., Wood, E. R. und Earnshaw, W. C.** (1994). ScII: an abundant chromosome scaffold protein is a member of a family of putative ATPases with an unusual predicted tertiary structure. *J Cell Biol* **127**, 303-18.
- Saka, Y., Sutani, T., Yamashita, Y., Saitoh, S., Takeuchi, M., Nakaseko, Y. und Yanagida, M.** (1994). Fission yeast cut3 and cut14, members of a ubiquitous protein family, are required for chromosome condensation and segregation in mitosis. *Embo J* **13**, 4938-52.
- Savvidou, E., Cobbe, N., Steffensen, S., Cotterill, S. und Heck, M. M.** (2005). *Drosophila* CAP-D2 is required for condensin complex stability and resolution of sister chromatids. *J Cell Sci* **118**, 2529-43.
- Schleiffer, A., Kaitna, S., Maurer-Stroh, S., Glotzer, M., Nasmyth, K. und Eisenhaber, F.** (2003). Kleisins: a superfamily of bacterial and eukaryotic SMC protein partners. *Mol Cell* **11**, 571-5.
- Schmiesing, J. A., Gregson, H. C., Zhou, S. und Yokomori, K.** (2000). A human condensin complex containing hCAP-C-hCAP-E and CNAP1, a homolog of *Xenopus* XCAP-D2, colocalizes with phosphorylated histone H3 during the early stage of mitotic chromosome condensation. *Mol Cell Biol* **20**, 6996-7006.
- Schmitt, E. A. und Dowling, J. E.** (1994). Early eye morphogenesis in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J Comp Neurol* **344**, 532-42.
- Solnica-Krezel, L., Schier, A. F. und Driever, W.** (1994). Efficient recovery of ENU-induced mutations from the zebrafish germline. *Genetics* **136**, 1401-20.
- Steffensen, S., Coelho, P. A., Cobbe, N., Vass, S., Costa, M., Hassan, B., Prokopenko, S. N., Bellen, H., Heck, M. M. und Sunkel, C. E.** (2001). A role for *Drosophila* SMC4 in the resolution of sister chromatids in mitosis. *Curr Biol* **11**, 295-307.
- Stemple, D. L.** (2004). TILLING--a high-throughput harvest for functional genomics. *Nat Rev Genet* **5**, 145-50.
- Streisinger, G., Coale, F., Taggart, C., Walker, C. und Grunwald, D. J.** (1989). Clonal origins of cells in the pigmented retina of the zebrafish eye. *Dev Biol* **131**, 60-9.
- Streisinger, G., Singer, F., Walker, C., Knauber, D. und Dower, N.** (1986). Segregation analyses and gene-centromere distances in zebrafish. *Genetics* **112**, 311-9.
- Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D. und Singer, F.** (1981). Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* **291**, 293-6.

-
- Strunnikov, A. V., Hogan, E. und Koshland, D.** (1995). SMC2, a *Saccharomyces cerevisiae* gene essential for chromosome segregation and condensation, defines a subgroup within the SMC family. *Genes Dev* **9**, 587-99.
- Sutani, T., Yuasa, T., Tomonaga, T., Dohmae, N., Takio, K. und Yanagida, M.** (1999). Fission yeast condensin complex: essential roles of non-SMC subunits for condensation and Cdc2 phosphorylation of Cut3/SMC4. *Genes Dev* **13**, 2271-83.
- Takemoto, A., Kimura, K., Yanagisawa, J., Yokoyama, S. und Hanaoka, F.** (2006). Negative regulation of condensin I by CK2-mediated phosphorylation. *EMBO J* **25**, 5339-48.
- Takemoto, A., Kimura, K., Yokoyama, S. und Hanaoka, F.** (2004). Cell cycle-dependent phosphorylation, nuclear localization, and activation of human condensin. *J Biol Chem* **279**, 4551-9.
- Tye, B. K.** (1999). MCM proteins in DNA replication. *Annu Rev Biochem* **68**, 649-86.
- Ueno, M., Katayama, K., Yamauchi, H., Nakayama, H. und Doi, K.** (2006). Cell cycle progression is required for nuclear migration of neural progenitor cells. *Brain Res* **1088**, 57-67.
- Uzbekov, R., Timirbulatova, E., Watrin, E., Cubizolles, F., Ogereau, D., Gulak, P., Legagneux, V., Polyakov, V. J., Le Guellec, K. und Kireev, I.** (2003). Nucleolar association of pEg7 and XCAP-E, two members of *Xenopus laevis* condensin complex in interphase cells. *J Cell Sci* **116**, 1667-78.
- Vagnarelli, P., Hudson, D. F., Ribeiro, S. A., Trinkle-Mulcahy, L., Spence, J. M., Lai, F., Farr, C. J., Lamond, A. I. und Earnshaw, W. C.** (2006). Condensin and Repo-Man-PP1 co-operate in the regulation of chromosome architecture during mitosis. *Nat Cell Biol* **8**, 1133-42.
- Viera, A., Gomez, R., Parra, M. T., Schmiesing, J. A., Yokomori, K., Rufas, J. S. und Suja, J. A.** (2007). Condensin I reveals new insights on mouse meiotic chromosome structure and dynamics. *PLoS ONE* **2**, e783.
- Waid, D. K. und McLoon, S. C.** (1998). Ganglion cells influence the fate of dividing retinal cells in culture. *Development* **125**, 1059-66.
- Walker, C. und Streisinger, G.** (1983). Induction of Mutations by gamma-Rays in Pregonial Germ Cells of Zebrafish Embryos. *Genetics* **103**, 125-136.
- Watrin, E. und Legagneux, V.** (2005). Contribution of hCAP-D2, a non-SMC subunit of condensin I, to chromosome and chromosomal protein dynamics during mitosis. *Mol Cell Biol* **25**, 740-50.
- Wehman, A. M., Staub, W., Meyers, J. R., Raymond, P. A. und Baier, H.** (2005). Genetic dissection of the zebrafish retinal stem-cell compartment. *Dev Biol* **281**, 53-65.

Wienholds, E. und Plasterk, R. H. (2004). Target-selected gene inactivation in zebrafish. *Methods Cell Biol* **77**, 69-90.

Wienholds, E., Schulte-Merker, S., Walderich, B. und Plasterk, R. H. (2002). Target-selected inactivation of the zebrafish *rag1* gene. *Science* **297**, 99-102.

Willer, G. B., Lee, V. M., Gregg, R. G. und Link, B. A. (2005). Analysis of the Zebrafish *perplexed* mutation reveals tissue-specific roles for de novo pyrimidine synthesis during development. *Genetics* **170**, 1827-37.

Xing, H., Wilkerson, D. C., Mayhew, C. N., Lubert, E. J., Skaggs, H. S., Goodson, M. L., Hong, Y., Park-Sarge, O. K. und Sarge, K. D. (2005). Mechanism of *bsp70i* gene bookmarking. *Science* **307**, 421-3.

Yeong, F. M., Hombauer, H., Wendt, K. S., Hirota, T., Mudrak, I., Mechtler, K., Loregger, T., Marchler-Bauer, A., Tanaka, K., Peters, J. M. et al. (2003). Identification of a subunit of a novel Kleisin-beta/SMC complex as a potential substrate of protein phosphatase 2A. *Curr Biol* **13**, 2058-64.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit habe ich eine Mutation in der CAP-G Untereinheit des Condensin-Komplexes beim Zebrafisch kloniert. Die Zebrafisch-Mutante *creature from the black lagoon* (*cbl*) zeichnet sich durch kleine Augen aus, die ab Tag 3 nach der Fertilisation deutlich von der wt-Form zu unterscheiden sind. Meine Untersuchungen zeigen, dass dieser Phänotyp auf einer Reduktion der Zellzahl der neuronalen Retina beruht, die durch eine hohe Apoptose-Rate in der mutanten Retina zustande kommt. Daneben findet sich starke Apoptose auch in weiteren Teilen des zentralen Nervensystems.

Durch positionelles Klonieren wurde als Ursache für den Phänotyp der *cbl*-Mutante eine Punktmutation in der CAP-G-Untereinheit des Condensin-Komplexes gefunden. Diese führt zu einem Stop-Codon in der Mitte des Gens und zum Verlust der C-terminalen Hälfte des Proteins mit der UVR-Domäne und der PH-Domäne.

Das Muster der Expression von *cap-g* korreliert mit dem Muster der Zellproliferation in der Retina. In der *cbl*-Mutante weisen die Zellen der neuronalen Retina Zellteilungsdefekte in Form von Chromosomenbrücken und deformierten Zellkernen auf. Die Zellen der neuronalen Retina weisen keine Zellzyklusverzögerungen auf und leiten die Apoptose während der Mitose ein.

Mit der *cbl*-Mutante ist nun ein genetisches Modell verfügbar, um die Funktion des Condensin-Komplexes in der Embryonalentwicklung von Vertebraten zu untersuchen.

7 Summary

In this study, I cloned a mutation in the CAP-G subunit of the condensin-complex in the zebrafish (*Danio rerio*). The zebrafish mutant *creature from the black lagoon* (*cbl*) is characterized by its small eyes, which are prominent at 3 dpf. I showed that this phenotype results from a reduction of cell number in the neural retina which is caused by a high rate of apoptosis in the mutant retina. A high rate of apoptosis is also found in other parts of the central nervous system.

By positional cloning, a point mutation in the *zcap-g* gene was identified as the cause for the phenotype of the *cbl*-mutant. This point mutation leads to a stop codon in the middle of the gene and causes a truncation and loss of the c-terminal UvR- and PH-domains in the protein.

The expression pattern of *zcap-g* correlates with the pattern of cell proliferation in the retina. In the *cbl*-mutant the cells of the neural retina display defects in cell division which lead to chromatin bridges and deformed nuclei. The cells of the neural retina do not show cell cycle delay and induce apoptosis during mitosis.

With the *cbl*-mutant we now have a genetic model to examine condensin function in the embryonic development of vertebrates.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

AO	Acridine Orange
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphat
bp	Basenpaare
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridine
BSA	Bovine Serum Albumin
<i>cbl</i>	die Zebrafisch-Mutante <i>creature from the black lagoon</i>
cM	Centi Morgan
CMZ	Ciliary Marginal Zone,
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid (Mischung aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
dpf	days post fertilization (Tage nach der Befruchtung, Altersangabe von Fischlarven, die bei 28,5 °C aufgezogen wurden)
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
ECL	Enhanced Chemiluminescence (HRP, Luminol)

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENU	N-ethyl-N-nitrosourea ($C_3H_6N_3O_2$)
EST	Expressed Sequence Tag
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GCL	Ganglion Cell Layer
GFP	Green Fluorescent Protein
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfon-Säure)
hpf	hours post fertilization (Stunden nach der Befruchtung, Altersangabe von Fischembryonen, die bei 28,5 °C aufgezogen wurden)
HRP	Horse Raddish Peroxidase
INL	Inner Nuclear Layer
INT	4-Iodonitrotetrozolium Violet
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
KO	Knockout
LB-Medium	Luria-Broth-Medium
M	molar
MDC	Max-Delbrück-Centrum
NaAc	Natriumacetat
NBT	Nitro Blue Tetrazolim Chloride
NGS	Normal Goat Serum
NTP	Nukleotid (Mischung aus ATP, CTP, GTP und UTP)
PAC	P1 Derived Artificial Chromosome
PBDT	PBS mit DMSO und Triton
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBT	PBS mit Triton
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd
PRL	Photoreceptor Layer
PTU	1-Phenyl-2-Thiourea
RFP	Red Fluorescent Protein

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPE	Retinal Pigment Epithelium
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RRX	Rhodamine Red-X
S	Sedimentationskoeffizient
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSC	Sodium Chloride/Sodium-Citrate Buffer
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
SSLP	Simple Sequence Length Polymorphism
T51	Goodfellow T51, Tübingen Map
TBS	Tris Buffered Saline
TE	Tris-HCl/Na ₂ -EDTA-Buffer
TILLING	Targeting Induced Local Lesions in Genomes
Torula	<i>Candida utilis</i> (früher <i>Torulopsis</i> oder <i>Torula utilis</i>), eine Hefe, hier verwendet für tRNA aus dieser Hefe
TRIS	1-amino-2-hydroxymehtyl-1,3-propanediol
tRNA	Transfer-RNA
TüLF	Tübingen Long Fin, ein stabiler, durch Inzucht erzeugter (inbred) Fischstamm (Wildtyp)
TUNEL	Transferase mediated dUTP Nick End Labeling Assay
UTR	Untranslated Region, nicht in Protein translatierte Gensequenz
WIK	Wildtype India Kalkutta, ein stabiler, durch Inzucht erzeugter (inbred) Fischstamm (Wildtyp)
wt	Wildtyp
YAC	Yeast Artificial Chromosome
ZNS	Zentralnervensystem

Hier nicht aufgeführte Abkürzungen sind SI-Einheiten, chemische Summenformeln oder Eigennamen.

8.2 Marker und getestete Embryonen

Tab. A1: Primer für ausgewählte Marker

z7353_fw	GGTGGAGCGGTGATTTATGT
z7353_rv	TTCTGTGGAAGAGTGTGACTGA
zK200F3c_fw	GGGAGAGAAAGTAAGAAAGTCAGACA
zK200F3c_rv	CACTTCATATTGCCCTACAAAGTAAA
zC208N2a_fw	GTAGCAAAATTTGACCATACACAAAC
zC208N2a_rv	ATTATGCCAATAAAAAATCACAGAACA
zC182L2b_fw	AGTGAATCAGAACACAAAACAACTC
zC182L2b_rv	TTTAGTGTTAGAAATCGGACATACAGC
zK237H21c_fw	TTATTTTTCGGCTTAGTGCTTTTATT
zK237H21c_rv	CACAATCAAAAATAACTCTTGCAACT
z7287_fw	TAATTGAGCCTCACCCGC
z7287_rv	TGTGACAATACACTCGCTGATG
z6911_fw	TGTGACGGGAACAAGTGAGA
z6911_rv	GTTTATGGCCATGCACGAG
zK148F2b_fw	CTTGTCACAACTTTCTTTCTTGTGT
zK148F2b_rv	ACGAATTATCTTTGGTGTTATTCTCA
NA165a_fw	GTCTGTTTGTTTGTGTGTAACTCCT
NA165a_rv	TGCAAACATTCTATAATCTCTCCAAG
zC283K4a_fw	AGCCACAACAGGAAATAAAAATAAAAA
zC283K4a_rv	TGACACACAGAAATTGAATACTGAAA
zC209P5a_fw	GAACTGAACTTCCAACCTTTACAACAA
zC209P5a_rv	TTTGTTACCAAAACCAAAATACAGAA
25.11_fw	AACGGAAATGTAAAATGTAAAACCTGAAT
25.11_rv	AATAGAGGTGTAAATATGGTCTGAAATGT

Tab. A2: Ausgewählte Marker und getestete Embryonen (nächste Seiten)

Platte Nr.	Embryo	z7353	zK200F3c	zC208N2a	zC182L2b	zK237H21c	z7287	z6911	zK148F2b	NA165a	zC283K4a	zC209P5a	25.11
1 (94Meiosen)	A2	x											
	F1	x											
	H1	x											
2 (58)	/												
3 (60)	B9	x											
4 (96)	/												
5 (69)	/												
6-8 (214)	6E2	x											
	6E8	x											
	6D12	x											
	7E2	x											
	8G4	x											
14	B12					/	/	/	/	x	x	x	x
	H11					/				/	/	x	x
15 (83)	F1	x				x	x	x		x	x	x	x
17 (96)	A3	x	/										
	D11	x	x	x	x	x	/	/	/				
18 (96)	A3	x	/										
	A6					/	/	/	/	x	x	x	
	A7	x	x	x	x	x	x	x	/				
	C9	x	x	x	x	x	/	/	/				
	D7	x					/	/	/				
	D10	x						/					
	E8					/		/	/	/	/	x	
	E10	x						/					
	F7	x	/										
	F8	x	/										
	H5	x	/										
19 (96)	A5	x	x	/	/	/							
	C5	x	/										
	E1					/	/	/	/	x	x	x	x
	E5	x				/	/	/	/				
	F3	x	x	/	/								
	G8	x	/										
20 (86)	A1	x	/										
	A12	x	/										
	B10	x	/										
	D7	x	/										
	E6	x	/										
	E10	x	/										
	H2	x	/										

21 (56)	D3					/	/	/	/	x	x	x	x
	D4	x	/										
	D5	x	/										
	D6					/		/	/	x	x	x	x
	F6					/		/	/	x	x	x	x
22 (94)	A8											/	x
	A12	x	x	x	x	/	/	/	/				
	C1	x	/										
	F3	x	/										
	F9	x	/										
	H11	x	x	/	/								
23 (94)	A7	x	/										
	C10*	*	/										
	C11	x	/										
24 (82)	D7	x	x	x	x		/	/	/				
25 (92)	A5	x	/										
	B8	x	/										
	B12					/		/	/	x	x	x	x
	C2	x	x	/	/							/	x
	C3												
	E4	x	x	x	x		/	/	/				
	F9	x	/										
	G9					/		/	/	x	x	x	x
	H8											/	x
26 (77)	A3	x	/										
	A10	x	/										
	B4	x	/										
	B12	x	/										
	E5	x	/										
	F9	x	x	/	/			/	/				
	G3	x	/										
	G6					/	/	/	/	x	x	x	x
27 (72)	B11	x				/		/	/				
	D12	x	/										
	E8	x	/										
28 (93)	D10	x	/										
	E10	x	/										
29 (96)	A9	x	/										
	A12	x	/										
	C1	x	x	/	/	/		/	/				
	D4	x	/										
	D8	x	/										
	G5	x	/										
31 (95)	C4					/	/	/	/	x	x	x	
	C5	x	x	/	/		/	/	/				
	D6	x	/										
	E4	x	/										
	F2					/	/	/	/	x		x	
	G8	x	/										

32 (95)	B3	x	/										
	B12	x	/										
	E11	x	x	/	/			/	/				
	G4	x	x	x	/			/	/				
33 ()	F2		x			/	/						

8.3 Tabellen

Tab. A3: Anzahl der Zellkerne in Schnitten von 3 dpf Embryonen

	GCL	INL	PRL	CMZ u. N.D.	Σ
<i>cbl</i> s053	88	220	32	61	401
<i>cbl</i> s063	91	354	51	78	574
<i>cbl</i> s076	87	239	59	35	975
<i>cbl</i> s085	89	254	52	58	453
<i>cbl</i> s021	138	293	60	69	560
<i>cbl</i> s028	73	243	14	43	373
<i>cbl</i> s033	103	318	58	88	567
<i>cbl</i> s053	29	193	21	65	308
<i>cbl</i> s094	66	297	37	42	442
Σ	764	2411	384	539	4653
Average	152.8	482.2	76.8	107.8	517
Standard Deviation	29.238007988	51.177251891	17.3060683	17.524585904	195.24215733
wt s027	233	702	171	105	1211
wt s037	228	670	178	58	1134
wt s042	207	654	193	67	1121
wt s043	171	534	162	62	929
wt s058	111	511	130	57	809
wt s078	253	669	161	72	1155
Σ	1203	3740	995	421	6359
Average	200.5	623.33333333	165.83333333	70.166666667	1059.83333333
Standard Deviation	51.945163394	79.989165933	21.141586191	17.971273374	155.68226189

Tab. A4: Messung Zellkerngröße 42 hpf, Anzahl Zellkerne nach Größe in Pixeln

	wt 1	wt 3	wt 3	wt 4	cbl 1	cbl 2	cbl 3	cbl 4
bis 599	34	63	42	42	17	16	22	24
600-699	40	51	63	42	34	25	23	13
700-799	48	55	59	39	32	29	24	17
800-899	59	79	50	43	37	37	30	18
900-999	45	52	75	45	35	35	28	15
1000-1099	46	36	54	31	25	32	29	17
1100-1199	32	28	37	43	22	23	27	15
1200-1299	25	17	25	33	17	22	23	15
1300-1399	28	13	15	33	17	18	19	27
1400-1499	24	5	14	21	14	20	16	12
1500-1599	14	12	17	13	9	26	17	6
1600-1699	11	5	6	15	12	8	10	8
1700-1799	13	3	3	11	11	11	15	13
1800-1899	7	1	5	12	10	4	7	13
1900-1999	7	1	4	8	5	8	10	7
2000-2099	2	0	4	6	7	11	10	6
2100-2199	7	2	0	9	4	6	2	4
2200-2299	3	0	1	3	3	3	6	5
2300-2399	1	0	0	1	3	1	6	3
2400-2499	4	0	0	1	1	2	2	6
2500-2599	1	0	0	0	0	4	4	1
2600-2699	1	0	1	0	2	2	3	3
2700-2799	1	0	0	1	3	3	1	6
2800-2899	1	0	0	0	2	0	2	2
2900-2999	1	0	0	0	4	1	1	4
ab 3000	2	0	1	0	10	2	8	10
Summe	457	423	476	452	336	349	345	270

Tab. A5: Messung der Zellkerngröße wt 40 hpf, Anzahl Zellkerne nach Größe in Pixeln

	wt 40 hpf
bis 599	10
600-699	12
700-799	11
800-899	13
900-999	17
1000-1099	14
1100-1199	22
1200-1299	18
1300-1399	17
1400-1499	18
1500-1599	12
1600-1699	15
1700-1799	18
1800-1899	16
1900-1999	20
2000-2099	10
2100-2199	12
2200-2299	11
2300-2399	10
2400-2499	11
2500-2599	5
2600-2699	3
2700-2799	5
2800-2899	1
2900-2999	4
ab 3000	10
Summe	315

9 Danksagung

Ich danke Dr. Salim Seyfried, dass ich meine Dissertation in seinem Labor im Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin anfertigen durfte. Ich danke meinen MitdoktorandInnen, den Laborantinnen und Tierpflegern für die gute Zusammenarbeit. Besonders bedanke ich mich bei Stefan Rohr und Elena Cibrian Uhalte für interessante Diskussionen und gegenseitige Unterstützung. Bei Dr. Andreas Hejnl und Frederike Alwes bedanke ich mich fürs Korrekturlesen und die konstruktiven Kommentare. Bei Prof. Dr. Ralf Schnabel bedanke ich mich für die Annahme meiner Arbeit zur Promotion.